

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

De la terre à l'espace: entre résistances extrêmes et réparation d'ADN chez le rotifère bdelloïde *Adineta vaga*

Silvestre, Martin

Award date:
2018

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



Faculté des Sciences

**De la terre à l'espace: entre résistances extrêmes et réparation d'ADN chez le rotifère
bdelloïde *Adineta vaga***

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Martin SILVESTRE

Janvier 2018

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

**De la terre à l'espace : entre résistances extrêmes et réparation du génome
des rotifères bdelloïdes *Adineta vaga***

SILVESTRE Martin

Résumé

L'environnement spatial est un challenge pour les organismes vivants. De plus, quelques organismes semblent être capable de faire face à des conditions extrêmes comme le vide, la microgravité et à différents types de radiations. Dans ce mémoire, nous avons étudié le rotifère bdelloïde *Adineta vaga* qui est candidat pour devenir un nouvel organisme modèle pour investiguer comment les êtres vivants peuvent faire face à des environnements extrêmes, y compris l'espace. Pour cela nous avons regardé les résistances d'individus d'*A. vaga* desséchés ou hydratés envers différents stress (ex. la température, les UV-B, le vide). Nous avons de plus commencé une étude sur les mécanismes de réparation des cassures doubles d'ADN. En effet *A. vaga* est connu pour réparer en quelques heures les dommages à l'ADN induit par la dessiccation et /ou les irradiations.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

Promoteur: K. van DONINCK

Remerciements

Je tiens à remercier Prof. Karine van DONINCK pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe et d'avoir été ma promotrice lors de ma thèse de master et de la relecture dernière minute ! ;-).

Particulièrement Boris HESPEELS pour avoir été mon tuteur tous au long de mon séjour, et m'avoir appris la vie dans un laboratoire. Je lui souhaite la réussite de son projet RISE. Je remercie aussi Véronique BAUMLE et Cécile BOPP qui m'ont tant aidé et appris.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du LEGE pour leur accueil chaleureux : Mme. J. VIRGO, Mme. C. DEMAZY, Mme. M. CARIOU, M. J. MARESCAUX, M. J. NARAYAN, M. M. TERWAGNE, M. N. DEBORTOLI, M. A. DERZELLE, M. L. HERTER et dernièrement M. M. VASTRADE. Ainsi que Prof. B. HALLET et tous les membres, chercheurs, techniciens et mémorants de l'URBE.

Mon mémoire n'aurait pas pu avoir lieu dans de si bonnes conditions sans la participation de Prof. F. CHAINIAUX et de Mme. E. BAUWENS de l'URBC qui m'ont permis d'utiliser leurs matériels au sein de l'URBC.

Merci à Mme. V. CORNET et M. J. MALAISSE pour l'aide immense dans l'analyse statistique des résultats.

Ni également Prof. S. LUCAS et M. T. TABARRANT du LARN qui ont acceptés de me recevoir pour permettre l'irradiation et la mise sous vide de mes animaux et cela même à des heures très matinales.

Je n'oublie pas Prof. S. BAATOUT, M. R. VERNEESEN et M. B. BASELET du SCK-CEN de Mol pour mon expérience en microgravité qui a malheureusement échoué.

En dernier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury, Prof. F. CHAINIAUX, Mme. K. PONCIN, M. D. COUPEAU et M. O. FINET.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	2
<i>Table des matières</i>	3
<i>Abbréviation</i>	4
<i>1 Introduction</i>	5
<i>2 Résultats</i>	21
<i>3 Discussions et perspectives</i>	35
<i>4 Matériels et méthodes</i>	43
<i>Bibliographie</i>	48
<i>Sites</i>	53

Abbréviation

<i>A. vaga</i>	<i>Adineta vaga</i>
CPDs	Dimères cyclobutyliques de pyrimidine
DNA DSBs	Cassures doubles brins de l'ADN
HR	Recombinaison Homologue
LR	Réhydratation lente
NHEJ	Jonction des extrémités non homologues
QR	Réhydratation rapide
RI	Radiation ionisante
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène
UV	Ultraviolet

1	Introduction	5
1.1.	Description morphologique des rotifères bdelloïdes	6
1.2.	Les rotifères bdelloïdes	7
1.2.1.	Un scandale de l'évolution	7
1.2.2.	Les rotifères bdelloïdes : une structure de génome particulière	7
1.3.	Résistances extrêmes des rotifères bdelloïdes	17
1.3.1.	Résistance à la dessiccation : l'anhydrobiose	17
1.3.2.	Résistance à la température	10
1.3.3.	Résistance aux rayonnements : ionisants ou non ionisants	11
1.3.3.1.	Variabilité des organismes	11
1.3.3.2.	Domages des rayonnements ionisants	12
1.3.3.3.	Résistances des rotifères bdelloïdes aux radiations ionisantes	13
1.3.3.4.	Les ultraviolets	13
1.3.3.5.	Effets des UV-B sur les rotifères bdelloïdes	13
1.3.4.	Résistance à de très faible pressions : le vide	14
1.4.	Mécanismes de résistance	14
1.4.1.	Diversité des mécanismes de résistances	14
1.4.2.	Les sucres comme protection	15
1.4.3.	Les LEAs	16
1.4.4.	Les HSPs	16
1.5.	L'espace	16
1.5.1.	Les radiations spatiales	17
1.5.2.	Les différents espaces	17
1.5.3.	Le vide spatial	17
1.6.	Réparation de l'ADN	37
1.6.1.	La réparation homologue	19
1.6.2.	La réparation de jonction des extrémités non homologues	19
1.7.	Objectifs du mémoire	20

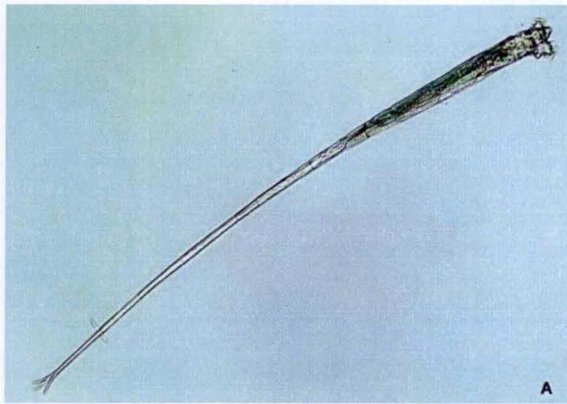


Figure 1. *Rotaria neptunia* et son long pied, lui permettant d'atteindre plus de 1mm de long (Örstan 2017)

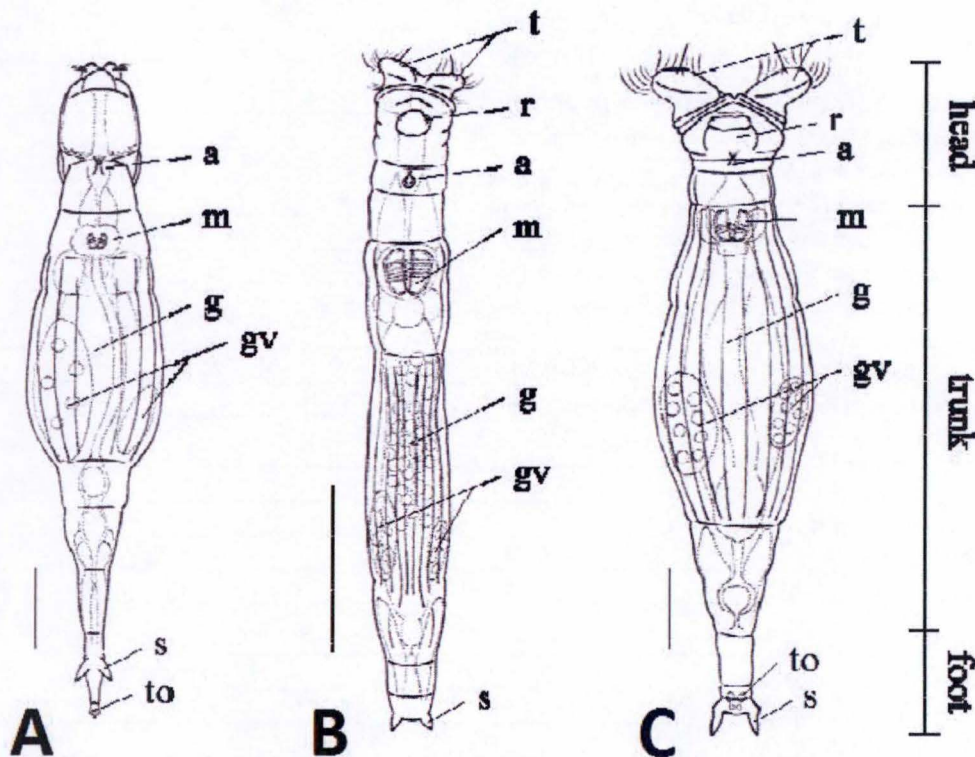


Figure 2 : Exemple de rotifères bdelloïdes : A) *Adineta vaga*, B) *Habrotrocha gracilis*, C) *Philodina vorax*. a, antenne dorsale; g, intestin; gv, germovitellaria; m, mastax; r, rostrum; s, éperons; t, trochi; t, orteils. Les trois parties des rotifères bdelloïdes : head = tête, trunk = tronc et foot = pied. Bar d'échelle : 50µm. (Fontaneto 2001)

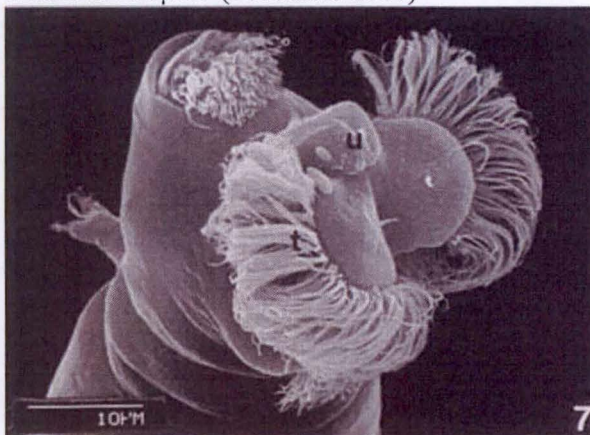


Figure 3 : Disques ciliés de l'espèce *Habrotrocha elusa*. u = lèvres supérieur ; t = trochus. (Melone & Ricci 1995)

1 Introduction

“Être vivant au sein de la mort. Être debout où l'air et l'eau sont un même rythme couché.”

— Edmond Jabès

Durant le 17^{ème} siècle une avancée importante en matière d'observation d'éléments microscopiques a eu lieu. Antoni van Leeuwenhoek développa en 1702 des lentilles ayant une puissance de grossissement jusqu'à 300 fois (livre *Essential Microbiology* Second edition). Il fut le premier à observer des bactéries ou les spermatozoïdes. Lors de l'une de ses observations sur de la poussière de gouttière, donc à priori sans vie au vu des connaissances de l'époque, après avoir ajouté de l'eau, il mit en évidence la possibilité de réhydrater des organismes desséchés. Parmi ces micro-organismes, il décrira des rotifères bdelloïdes, actives environ une heure après l'ajout de l'eau. Il nomma ces petits organismes, et les micro-animaux de manière générale les « animalcules ».

Ces animaux invertébrés font partie des métazoaires les plus petits existant sur terre. Ces animaux microscopiques appartiennent à la classe des Bdelloïdea qui contient quatre familles : *Adinetidae*, *Habrotrichidae*, *Philodinae* et *Philodinidae* (Donner 1965). De nos jours, plus de 461 espèces de rotifères bdelloïdes ont été morphologiquement décrites (Melone & Ricci 1995; Segers 2007). Ces animaux ont été trouvés vivants sur l'ensemble des continents et aussi dans des environnements extrême (tel que les régions glaciales d'antarctique et les déserts africains). Leurs habitats ont en commun d'être des environnements semi-terrestres (c.-à-d. un terrain partiellement terrestre et partiellement aquatique), comme les mousses et les lichens. Cette capacité à survivre dans de tels environnements, où l'eau n'est pas toujours présente à l'état liquide, est due à leur résistance à la dessiccation durant toutes les étapes de leur cycle de vie (Ricci 1987). L'absence d'eau est un stress qui induit des dommages (détaillés par la suite). Les rotifères bdelloïdes ont la capacité de réparer voire de se protéger des dommages induits par ces périodes plus ou moins longues de dessiccation (Alpert 2006; Hespeels et al. 2014). C'est cette capacité à survivre à des stresses extrêmes et les mécanismes de réparations des dommages qui feront l'étude de ce mémoire.

1.1. Description morphologique des rotifères bdelloïdes

Le nom bdelloïde vient du grec « bdella » signifiant la sangsue. C'est la ressemblance dans leur façon de se mouvoir avec ces annélides qui en est à l'origine, c'est-à-dire de ramper sur un substrat. En fonction des espèces leur taille varie de 150 à 500 µm de long. Cependant, certaines espèces mesurant exceptionnellement plus d'un millimètre ont été décrites (ex : *Rotaria neptunia*) (Fig. 1 ; Örstan 2017).

Ces animaux sont décrits comme eutélique (c.-à-d. le nombre de cellules après le développement embryonnaire reste le même au cours de leur vie, c'est une augmentation de la taille des cellules qui permet la croissance de cet organisme). Avec un corps constitué d'environ 1000 cellules, les rotifères bdelloïdes sont des animaux complets disposant de neurones, d'une musculature complexe, d'un système digestif, d'un système excréteur, notamment avec des néphridies et d'un système reproducteur (Ricci & Fontaneto 2009). Leur corps longiligne peut être divisé en 3 parties principales : la tête, le tronc et le pied (Fig. 2). Dans la partie apicale, celle de la tête, il y a une structure particulière chez les rotifères, la couronne ou roue. C'est de cette roue particulière que tire son origine le nom « Rotifère », la roue se disant « rota » en latin. C'est un appareil rotatif qui est caractérisé par deux disques ciliés, les trochis. Ils peuvent soit se trouver

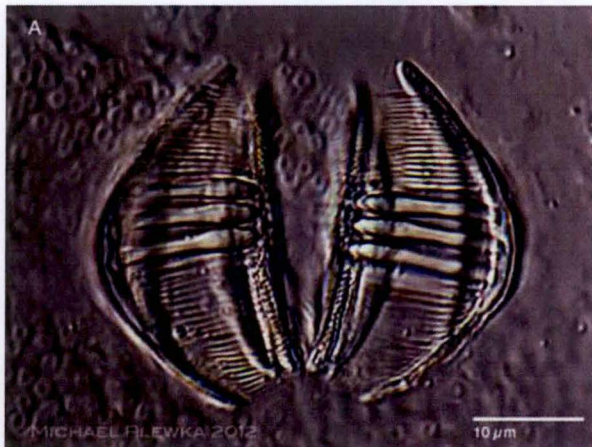


Figure 4. Trophi de *Dissotrocha macrostyla* (Örstan 2017)

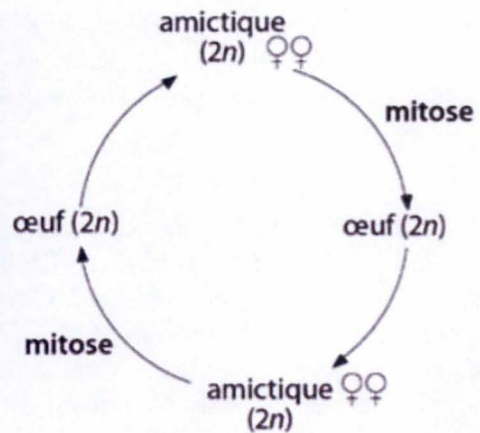


Figure 5. Cycle de vie du rotifère Bdelloïde

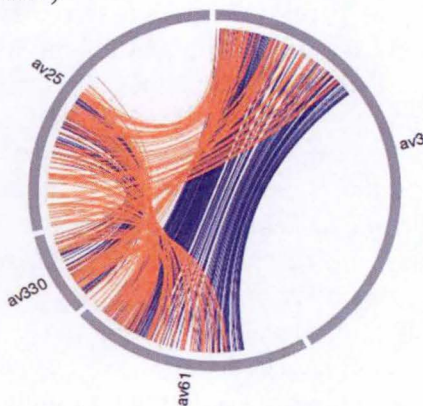


Figure 6 : Génome tétraploïde. Exemple d'un génome en quartet de deux paires alléliques. Les paires de gènes alléliques sont connectés avec les courbes violettes et les paires de gènes ohnologues sont connectés avec les courbes oranges. (Flot et al. 2013)

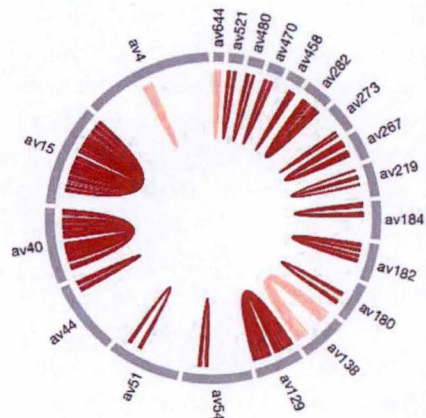


Figure 7 : Régions palindromiques. Dans 20 cas, les régions alléliques sont trouvées sur le même chromosome. Toutes les courbes montrent des paires de gènes alléliques. Dans 3 cas, les régions alléliques sont dans la même orientation (courbes roses) et dans 17 cas les régions sont inversées (courbes rouges). (Flot et al. 2013)

au niveau de la tête comme chez *Habrotrocha elusa* (Fig. 3) soit être présent au niveau ventral comme chez *A. vaga*. Ces rotors permettent de capter la nourriture, de nager et de ramper. Une deuxième structure nommée « rostrum » est décrite aussi dans cette partie du corps des bdelloïdes, c'est une structure rétractile qui sert à fixer le rotifère lors de la locomotion. Chez l'espèce étudiée au sein du laboratoire, *A. vaga*, le rostrum reste étendu pendant la locomotion. La deuxième partie du corps est constituée du tronc, avec l'ensemble du système digestif, les muscles de la locomotion et le système reproducteur étant bien visibles. Il est possible de voir une gonade de chaque côté du système digestif, et de la néphridie. Le mastax (Fig. 4) est un appareil masticatoire formé de structures comparables à des mâchoires, les trophis, qui sont en mouvement constant lors de l'ingestion de nourriture par les rotifères. C'est un caractère propre aux rotifères qui sert de délimitation d'espèces (au niveau morphologique). La région basale contient le pied grâce auquel les rotifères peuvent se fixer à un substrat au moyen de 2 à 4 orteils (Davis 1873; Melone & Ricci 1995; Fontaneto 2001; Örstan 2017).

1.2. Les rotifères bdelloïdes

1.2.1. Un scandale de l'évolution

Les rotifères bdelloïdes font partie des espèces du règne animal à se reproduire uniquement de façon asexuée. A l'heure actuelle, aucuns mâles ni hermaphrodites n'ont été décrits. Seuls des individus de sexe féminin ont été décrits avec un système reproducteur comprenant deux ovaires (Maynard 1986; Welch 2000). Les femelles sont dites amictique, elles contiennent dans leurs ovaires un nombre déterminé d'oocytes primaires, cellules à l'origine des ovules, qui ont la capacité de se développer en œuf sans fécondation (Pagani et al. 1993). Ces œufs sont pondus, puis ils vont se développer en une femelle eutélique, une nouvelle population clonale est ainsi développée à partir d'un seul œuf (Fig. 5). Les oocytes sont formés à partir de deux divisions mitotiques sans appariement de chromosomes ni de réduction en nombre de chromosomes (Hsu 1956). L'absence de reproduction sexuelle est théoriquement un cul de sac évolutif et devrait mener à l'extinction de l'espèce (Butlin 2002) parce qu'une reproduction sexuée augmente le taux d'évolution adaptative en générant des combinaisons de gènes et empêche l'accumulation de mutations délétères. Ce type de reproduction asexué devrait mener au long terme, à l'extinction, du à l'accumulation de mutations et l'absence de mécanismes créant de la variabilité à chaque génération (Ricci 2017). Tang en 2014 décrit que les rotifères bdelloïdes semblent persister depuis plus de 35 millions d'années avec cette reproduction asexuée (Tang et al. 2014). Le maintien de ce mode de reproduction asexuée leur a valu d'être qualifié de « scandale évolutif » par John Maynard Smith (1984).

1.2.2. Les rotifères bdelloïdes : une structure de génome particulière

A l'heure actuelle, une seule espèce de rotifères bdelloïdes ont un génome complètement séquencé. Ce premier séquençage a été publié en 2013 (Flot et al. 2013) chez la lignée des *A. vaga*, un séquençage du transcriptome de l'espèce *Rotaria magnacalcarata* a eu lieu en 2015 (Eyres et al. 2015). Avant ces séquençages de génome, des régions génomiques des rotifères bdelloïdes était déjà bien caractérisées (Mark Welch & Melselson 2000 ; Hur et al. 2009 ; Van Doninck et al. 2009). Dans ces études, il a été démontré qu'il existe plus de 2 copies pour un gène chez les bdelloïdes et ces copies peuvent être grandement divergentes entre elles. Grâce à ces données, une hypothèse avait été émise : le génome des rotifères bdelloïdes pourrait être un génome tétraploïde dégénéré (Mark Welch et al. 2008; Hur et al. 2009).

Le séquençage du génome complet d'*A. vaga* a confirmé cette tétraploïdie dégénérée (Flot et al. 2013) avec des régions homologues de faible divergence, tel que des allèles, et des régions homologues de divergence plus importante (Ks de 0.6 de moyenne), les ohnologues (Fig. 6).

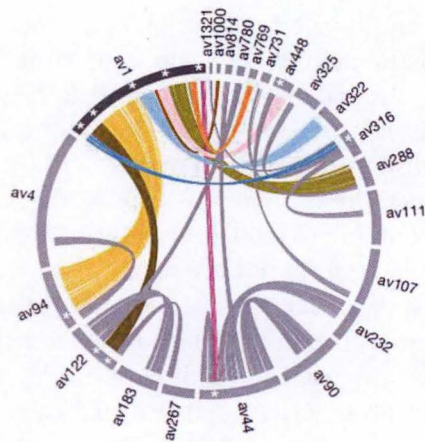


Figure 8 : Les astérisques représentent les points de rupture de colinéarité entre la région av1 et les copies alléliques se trouvant sur d'autres régions (Flot et al. 2013).

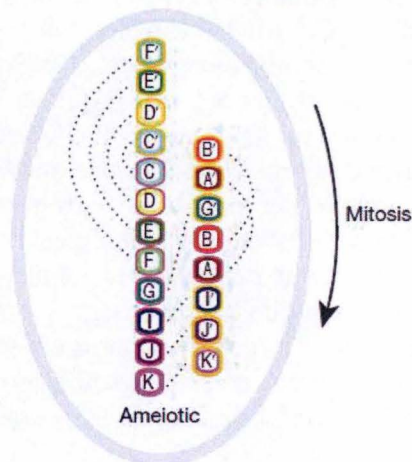


Figure 9 : Dans le génome d'*A. vaga*, les allèles sont distribués en bloc qui sont mélanger à travers les chromosomes. Induisant des répétitions intrachromosomales. Les chromosomes n'ont pas d'homologues et ne peuvent pas être jumelés (Flot et al. 2013).

Groupe	Données connues	Références
Nématodes	Beaucoup d'espèces	Wharton(2003); Treonis ans Wall (2005)
Rotifères	Beaucoup d'espèces, incluant la plupart des rotifères bdelloïdes	Ricci and Caprioli (2005)
Tardigrades	Beaucoup d'espèces	Wright (2001); Jönsson and Järemo (2003)
Crustacés	Embryons enkystés de plusieurs genres d'anostracés	Mitchell (1990); Clegg (2005)
Arthropodes	Larve de <i>Polypedilum vanderplanki</i>	Watanabe et al. (2004); Kikawada et al. (2005)
Lichens	La plupart des espèces testées	Kappen and Valladares (1999)
Levures	Quelques espèces	Garay-Arroyo et al. (2000)
Autres champignons	Quelques espèces	Mazur (1968)
Mousses	La plupart des espèces testées	Proctor and Tuba (2002)
Hépatiques	Beaucoup d'espèces	Proctor and Tuba (2002)
Ptéridophytes	Environ 50 espèces de sporophytes, probablement en état de spores	Pence (2000); Porembski and Barthlott (2000)
Gymnospermes	Seulement quelques graines et pollen	Porembski and Barthlott (2000); Dickie and Prichard (2002); Hoestra (2002)
Angiospermes	Avron 300 espèces d'adultes, avec plus de 95% sous forme de graines	Porembski and Barthlott (2000); Hoekstra (2002); Tweddle et al. (2003)
Bactéries	Beaucoup d'espèces, incluant les cyanobactéries	Billi and Potts (2002); Buedel et al. (2002); de la Torre et al. (2003)
Microalgues terrestres	Beaucoup d'espèces	Trainor and Gladych (1995)
Macroalgues marines	<i>Porphyra dentata</i>	Abe et al. (2001)

Tableau 1 : Liste non exhaustive d'espèces pouvant rentrer en anhydrobiose.

Sur les 43.000 gènes contenus chez *A. vaga*, 40% de ces gènes semblent être organisé en quartet. Étonnamment, certaines copies alléliques d'un même gène peuvent se trouver sur un même chromosome (Fig. 7). Dans certains cas, les allèles sont dans des sens opposés et organisés tel que des palindromes. On peut aussi observer 2 allèles disposées dans le même sens. Par ailleurs, on observe également dans ce génome des points de rupture de colinéarité, suggérant un remaniement de certaines régions alléliques (Fig. 8). Ces structures génomiques particulières retrouvées chez *A. vaga* suggèrent qu'au cours de l'évolution, les régions alléliques ont subi des réarrangements au sein d'un même chromosome ou entre chromosomes. Ces particularités sont à priori incompatibles avec le mécanisme classique de méiose, tant du point de vue de l'impossibilité de l'appariement de chromosomes homologues dû aux régions palindromiques que de l'impossibilité de la ségrégation de chromosomes homologues du fait des points de rupture de colinéarité (Fig. 9). Mais il n'est pas à exclure la possibilité d'une reproduction sexuée utilisant une méiose non conventionnelle où la ségrégation ne nécessiterait pas une paire de chromosomes homologues (Signorovitch et al. 2015).

1.3. Résistances extrêmes des rotifères bdelloïdes

1.3.1. Résistance à la dessiccation : l'anhydrobiose

Bien qu'essentiel pour la vie, certains organismes sont capables de se déshydrater en absence d'eau dans leur habitat et ensuite de se réhydrater avec succès après des périodes de sécheresses plus ou moins longues. Afin de résister à cette condition environnementale extrême, qui peut engendrer une perte d'eau interne dans l'organisme de plus de 95% (Watanabe 2006), les organismes rentrent dans un état d'anhydrobiose, un état particulier de la cryptobiose (Clegg 2001). La cryptobiose a été décrite comme « l'état d'un organisme quand il ne montre pas de signe visible de vie et quand son activité métabolique devient difficilement mesurable » (Keilin 1959). Dans le règne animal seulement trois clades contiennent des espèces qui savent résister à la dessiccation à n'importe quel stade de leur vie, les tardigrades, les nématodes et les rotifères bdelloïdes (Alpert 2005). Des arthropodes ont été décrits pouvant entrer en anhydrobiose mais uniquement en début de leur cycle de vie (Crowe 1971). Aucun organisme vertébré n'a été décrit comme ayant la capacité de rentrer en état d'anhydrobiose. Une des caractéristiques limitantes dans l'acquisition de la résistance à l'anhydrobiose est de nature morphologique, la taille. La majorité des invertébrés ont une taille inférieure à 5 mm, ceci n'est pas le cas chez les vertébrés (Watanabe 2006).

Chez les bactéries, *Deinococcus radiodurans* est celle qui est le plus renommée, étant connue pour sa résistance à la dessiccation et à la radiation (Slade & Radman 2011 ; Tableau 1). Cette caractéristique existe aussi dans le règne végétal, que cela soit des plantes ou des graines et pollens (Tableau 1 ; Buitink & Leprince 2004).

Cet état de quiescence pose une question importante : l'horloge biologique continue-t-elle de tourner pendant la période de dessiccation ou non. Deux possibilités existent, le premier modèle de « la belle au bois dormant » décrit que le processus de vieillissement est suspendu lors de la période de dessiccation. Le deuxième modèle est appelé le « portrait de Dorian Gray » d'Oscar Wilde où l'horloge biologique continue indépendamment de la durée de la période de dessiccation (Ricci & Caprioli 2005). Dans les deux modèles, il y a un arrêt du métabolisme de l'animal (Wright 2001). Il est possible de mesurer l'activité métabolique d'organismes de façon calorimétrique. Cette technique consiste à mesurer le flux de chaleur généré par le métabolisme d'un organisme, la valeur étant donnée en microwatt (μW). Il a été démontré chez le rotifère bdelloïde *Macrotrachela quadricornifera* que l'activité métabolique des individus étudiés

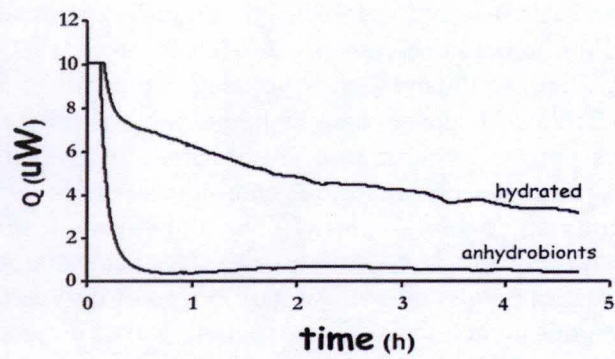


Figure 10 : Activité métabolique pendant l'anhydrobiose (μW), mesuré grâce au flux de chaleur. Courbe supérieure : Mesure calorimétrique du métabolisme de 600 *Macrotrachela quadricornifera* hydratés adultes dans 1 mL d'eau. Courbe inférieure : Mesure calorimétrique de 600 *M. quadricornifera* desséchés.
(Ricci 2017)

s'arrête après environ 30 minutes dans le stade d'anhydrobiose (Fig. 10 ; Ricci 2017). En ce qui concerne l'étude des 2 modèles chez les rotifères bdelloïdes, chez l'espèce *Philodina roseola*, il a été observé qu'après une dessiccation de 7 jours, la durée de vie est de 48,2 jours (en comptant les 7 jours de dessiccation). Cette durée est significativement supérieure à la durée de vie d'individus hydratés, qui est d'environ 40 jours. Si on enlève cette période de 7 jours, il n'y a plus de différence entre les deux durées de vie. De plus il a été observé qu'il y a une augmentation significative de la fécondité après la période de dessiccation (Ricci & Covino 2005). Cette observation a également été faite chez les espèces de rotifères *A. ricciae* et *M. quadricornifera*. Une période de dessiccation de 7 jours entraînent une augmentation significatives de la longévité et du taux de reproduction par rapport aux individus gardés uniquement hydratés (Ricci & Covino 2005; Ricci et al. 2007). Ces données suggèrent que les rotifères bdelloïdes suivent le modèle de la belle au bois dormant.

L'état de quiescence chez les rotifères bdelloïdes est caractérisé par un changement morphologique, on observe un état de tun. L'état de tun est caractérisé morphologiquement par une contraction générale du corps au moyen des muscles longitudinaux. La tête et le pied sont rétractés dans le tronc à la manière des tortues, ne laissant seulement ce dernier visible, laissant ainsi des plis à chaque extrémité des individus (Ricci et al. 2008; Marotta et al. 2010). Quant aux organes internes, ils sont empaquetés de façon ordonnée remplissant aussi le tronc de l'animal. Cette mise en conformation optimale n'est pas un processus rapide, afin de permettre aux organes de se placer correctement. De plus afin que les cellules puissent se préparer à résister à la perte massive d'eau, le processus de dessiccation doit être lent (Caprioli & Ricci 2001; Lapinski & Tunnacliffe 2003). Chez *P. roseola*, une décroissance rapide de l'humidité ambiante du milieu (qui engendre l'état d'anhydrobiose des organismes) entraîne un taux de survie faible (20%) après une période de 7 jours en dessiccation alors qu'une décroissance lente permet d'observer une survie supérieure à 90% chez des individus de cette même espèce (Caprioli & Ricci 2001 ; communication personnel de Boris HESPEELS). En état d'anhydrobiose, le volume des individus est divisé par deux et leur masse est diminuée de 96% par rapport à des individus hydratés (Ricci et al. 2008). Malgré le grand nombre de modifications induites par cet état, les organes et le métabolisme peuvent être de nouveau actifs après réhydratation après un court laps de temps. Après une dessiccation de 9 ans d'individus du genre *Mnibia*, le premier rotifère bdelloïde viable observé est apparu 2h30 après réhydratation (Guidetti & Jönsson 2002).

Un état d'anhydrobiose est défini par une présence d'eau interne dans l'organisme inférieur à $0,1 \text{ g H}_2\text{O} \cdot \text{g}(\text{poids sec})^{-1}$. Dans cet état, l'eau n'est pas à un niveau suffisant pour hydrater les protéines internes de l'organisme, induisant une absence d'activité métabolique (Clegg 1986; Potts 1994). Le manque d'eau entraîne un grand nombre de dommages cellulaires (ex. cassures des brins d'ADN, augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène) et une augmentation de la concentration en sel dans les cellules (Crowe et al. 1992). Cette modification osmotique est aussi suivie de la fusion des membranes phospholipidiques. Cette fusion des membranes est expliquée par le fait que les phospholipides qui la composent sont stabilisés par une douzaine de molécules d'eau par atome de phosphate, ce que représente environ 20% de la masse des membranes hydratées (Crowe et al. 1992). Sans les molécules d'eau qui permettent de séparer les groupes de phospholipides, ceux-ci ont la possibilité d'entrer en contact et donc de fusionner. En absence de disaccharides pour stabiliser cette fusion des membranes entraîne la fuite du contenu des vésicules au sein de la cellule. Un deuxième problème que soulève le manque d'eau est l'augmentation de la température de transition gel-fluide de la partie lipidique

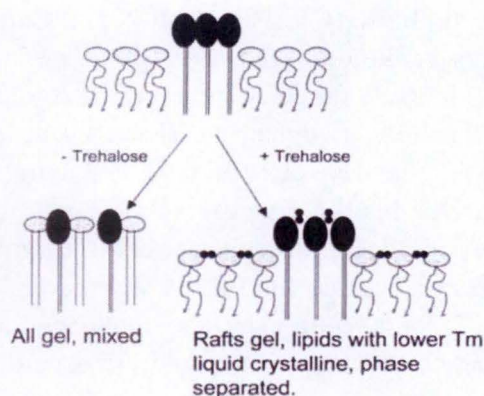


Figure 11 : Mécanisme de préservation de phase des membranes de phospholipides.
(Crowe 2007)

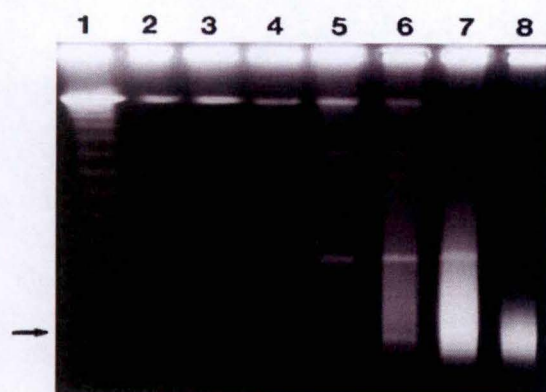


Figure 12 : Intégrité du génome de *D. radiodurans*. Ligne 1 : Ladder ; ligne 2 : ADN de *D. radiodurans* contrôle ; lignes 3 à 8 : ADN obtenu après 1, 4, 8, 14, 28 et 42 jours de dessiccation. La flèche indique le marqueur 48,5 kb.

(Mattimore & Battista 1996)

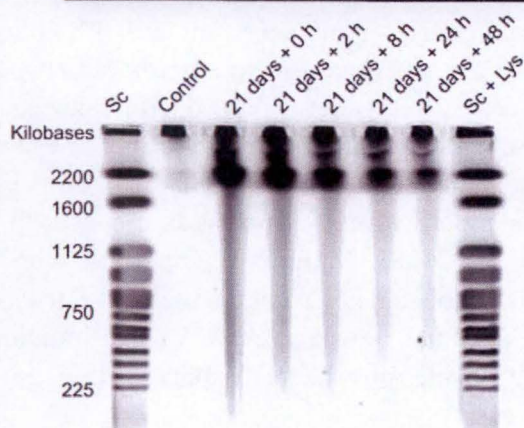


Figure 13 : Cinétique de réparation de l'intégrité du génome d'*A. vaga*. Ligne 1 : Ladder ; ligne 2 : ADN d'*A. vaga* contrôle ; Ligne 3 à 7 : ADN obtenu après 0, 2, 8, 24 et 48 heures post-réhydratation après une période de 21 jours en dessiccation ; ligne 8 : ladder.

(Hespeels et al. 2014)

des phospholipides. Cette modification permet aux lipides de passer dans un état de congélation à température ambiante, entraînant une phase semi solide qui une fois réhydraté est la raison de la fuite du contenu des vésicules (Fig. 11; Crowe et al. 1992).

De plus, lors de la dessiccation l'absence de métabolisme entraîne la disparition des mécanismes régulant les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS ; Kranner & Birtl 2005). Dans cet état, leur augmentation est due principalement à des réactions non enzymatiques (ex. captation d'un électron par les triplets d'oxygène : $^3\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^-$) et à des auto-oxydations. Les ROS formés engendrent des dommages sur les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Il a été montré qu'une période de dessiccation menait à l'apparition de nombreuses cassures double brins (DSBs pour Double strand Breaks) de l'ADN (DNA DSBs), avec une relation entre le temps passé et le nombre de cassures (Mattimore & Battista 1996; Hespeels et al. 2014). Chez la bactérie *D. radiodurans* il est possible d'observer une augmentation des DSBs en fonction du temps passé en dessiccation. Sur un gel d'agarose, après 42 jours seuls de petits fragments d'ADN étaient visibles aux alentours des 48,5kb (Fig. 12). Des fragments de cette taille n'étaient pas visible chez les individus contrôles (non desséchés). Cette observation a aussi été effectuée sur une souche d'*Escherichia coli*, démontrant que ces cassures étaient dues à la dessiccation. Lors de cette étude, une relation entre la résistance à la dessiccation et la résistance aux radiations ionisantes a été faite. Les souches de *D. radiodurans* radiosensible étaient aussi sensible à la dessiccation, c'est-à-dire que le taux de survie était plus faible que les souches « wild-types », qui étaient résistantes à la dessiccation et aux radiations (Mattimore & Battista 1996).

Les rotifères bdelloïdes *A. vaga* ont aussi été décrit comme subissant un nombre croissant de DSBs au cours d'une période de dessiccation. Après 84 jours de dessiccation, il est possible de voir une large fourchette de fragments de taille différentes, toutefois il est noté qu'il y a toujours la présence de grands fragments. Ces DNA DSBs sont réparées au cours de la période de réhydratation (Figure 13; Hespeels et al. 2014). La présence et l'augmentation des DNA DSBs en fonction du temps à l'état anhydrobiotique semble être partagée par certains organismes tolérant la dessiccation (tel que *Saccharomyces cerevisiae* et les larves *Chiropomid* ; Gladyshev & Meselson 2008; Rebecchi et al. 2009; Gusev et al. 2010; Hespeels et al. 2014).

1.3.2. Résistance à la température

Au sein de leur habitat éphémère, les rotifères bdelloïdes peuvent être exposés à un large panel de température. Certaines espèces ne sont trouvées que vivant dans les régions froides de l'Antarctique, tel *Habrotrocha angularis* (Segers 2007) ou *Adineta grandis* (que nous cultivons à 4°C au LEGE) ou ayant colonisé des régions plus chaudes du désert australien comme *A. acuticornus* et *Mniobia russeola*. D'autres espèces ont colonisé tous les continents comme rotifère bdelloïde *A. longicornis* (Segers 2007).

Les rotifères bdelloïdes ont été décrit comme pouvant survivre à des températures allant jusqu'à 151°C à l'état desséchés (Rahm 1924; Mertens et al. 2008). La vitesse d'augmentation de la température semble être un paramètre important. Une augmentation de plus de 100°C par minute pour atteindre la température de 130°C induit une mortalité de 100% chez des individus de l'espèce *P. roseola* desséchés. Alors qu'une augmentation d'environ 4°C par minute permet d'observer une survie de 1,77 % (Mertens et al. 2008). Par ailleurs les individus desséchés montrent aussi une importante résistance à la congélation. Il a été décrit une survie après une

Contribution de différentes sources de radiation

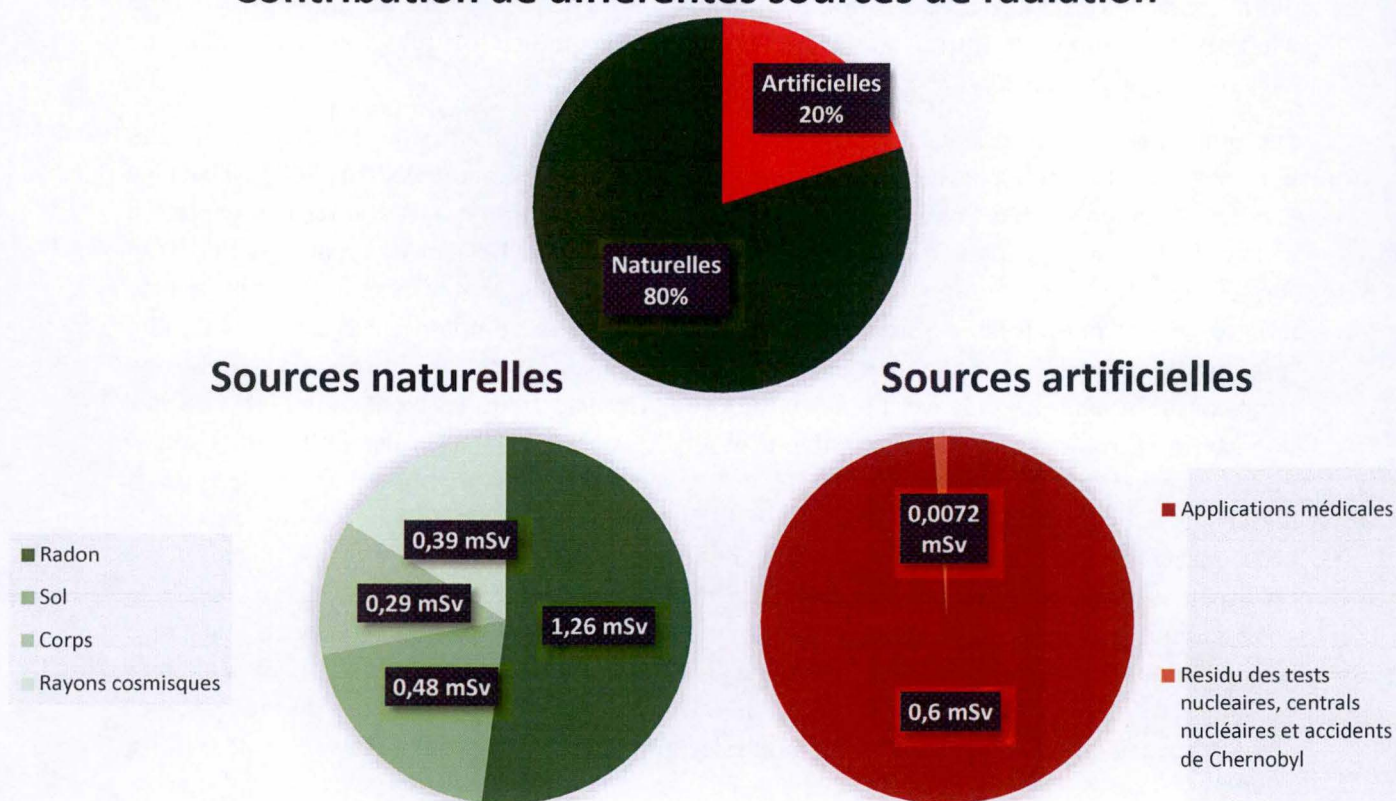


Figure 14 : Sources des rayonnements reçu par les organismes sur terre au cours d'une année.
Modifié de United Nations Scientific Committee 2008

Chien	2,5 Gy
Singe	3 Gy
Cochon	3 Gy
Souris	4 Gy
Homme	4,5 Gy
Grenouille	7 Gy
Lapin	7,5 Gy
Pin sylvestre	30 Gy
E. coli	52 Gy
Serpent	80 Gy
Nematode	100 Gy
Vesce craque	170 Gy
<i>D. radiodurans</i>	7.500 Gy
<i>Thermococcus gammatolerans</i>	30.000 Gy

Tableau 2 : DL50 par irradiation.

exposition a plusieurs températures proches du 0 absolu, soit -273,15°C chez plusieurs espèces (ex : *A. gracilis* et *P. roseola* ; Radzikowski 2013).

L'impact des fortes températures sur des rotifères bdelloïdes hydratés n'est pour le moment pas bien documenté. Seule une étude de Caprioli en 2002 a montré une absence de survie d'individus hydratés de l'espèce *M. quadricornifera* à 50°C, bien qu'elle survie à une exposition à -80°C pendant 16 heures (Caprioli & Ricci 2002).

Pour l'espèce *Adineta vaga*, la température optimale des individus hydratés est de 25°C. La diminution de cette température à 5°C entraîne une baisse de l'activité des individus de 87% (c.à.d. que les individus n'avaient aucunes réponses physiques après un stimuli physique). Pour une température de 40°C, cette activité diminue de 77% (Kanazawa et al. 2017). Cette étude complémente celle de Ricci en 1987, qui concluait que la température avait un impact sur la croissance et la fertilité d'individus de l'espèce *M. quadricornifera*. A 16°C, la croissance en taille était plus lente qu'à 20°C et 24°C, et la fertilité semblait plus faible à 16°C. (Ricci 1987)

1.3.3. Résistance aux rayonnements : ionisants ou non ionisants

Les rayonnements sont des ondes caractérisées par une longueur d'onde (λ) et mesurées en nm, et cette longueur d'onde permet de classifier les rayonnements. Les radiations ionisantes (RI) sont caractérisées par des courtes longueurs d'ondes (<100nm). Ces rayonnements ont une énergie capable de traverser la matière et de modifier le nombre d'électrons d'un atome. Les dégâts induits sur les tissus biologiques par ces rayonnements peuvent soit être immédiat avec la destruction des tissus, soit être visible à plus long terme avec l'apparition de cancers et de maladie héréditaires. Les radiations non ionisantes (entre 100 et 400 nm), principalement des UVs, sont quant à elles moins létales sur terre. Une majorité de ces UVs sont arrêtés par la couche d'ozone (United Nations Scientific Committee 2008). A chaque instant sur terre des radiations ionisantes ou non atteignent la surface de la terre. Les sources d'émissions peuvent être soit naturelles (ex : le soleil, des roches) soit d'origine humaines (ex : imagerie médicale, explosions nucléaires ; Fig. 14).

1.3.3.1. Variabilité des organismes

Il est nécessaire de différencier les deux unités utilisées pour quantifier la dose de radiations : le gray (Gy) est l'unité qui correspond à l'énergie reçu par la matière, et le sievert (Sv) est la dose biologique reçue par un tissu (irsn.fr). De nombreuses études ont porté sur la résistance d'organismes vivants et les conséquences d'une irradiation aux rayonnements ionisants, tant sur les animaux que sur l'homme après l'accident de Tchernobyl et les bombes nucléaires de Nagasaki et Hiroshima.

Ces observations ont montré qu'une exposition globale du corps à une dose de 4,5Gy entraîne la mort chez 50% des hommes après 6 mois (Mole 1984). Cette dose vient d'observations effectuées après des accidents d'irradiations thérapeutiques et d'accidents survenus dans des centres ou usines. Tous les êtres vivants ne sont pas égaux face à ces rayonnements (Sazykina et al. 2003), chaque espèce a une radiosensibilité qui lui est propre, la dose de rayonnements ionisants qui permet de tuer 50% d'une population (c.-à-d. LD50) varie énormément même au sein des mammifères (Table 2). Pour l'heure, l'organisme le plus résistant est *Thermococcus gammatolerans* (Jolivet et al. 2003). La LD50 est égale à 30.000Gy pour cette bactérie, D. radiodurans arrive en seconde place avec une LD50 de 7.500Gy.

Type	Yield	Reference
Single-strand breaks	1000	17
8-Hydroxyadenine	700	18
T* (thymine damage)	250	19
Double-strand breaks	40	17
DNA-protein cross-links	150	20

Figure 15 : Mesure du nombre de dommages par cellule et par gray. (Ward 1988)

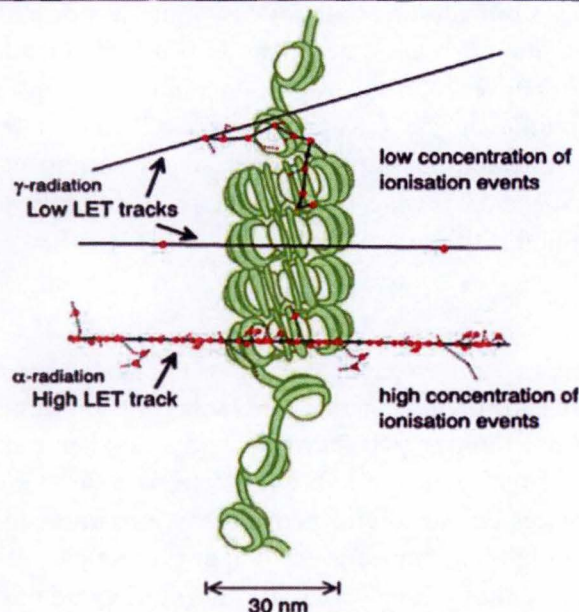


Figure 16 : Schéma des dommages engendrés par un faisceau avec un faible ou un haut transfert linéique d'énergie (TLE). Les points rouges représentent les événements de ionisations de la matière. Les radiations de faible TLE induisent des concentrations plus faibles d'évènements d'ionisation et donc moins de dommages complexes à l'ADN que les radiations à haut LTE (Lomaw et al., 2013).

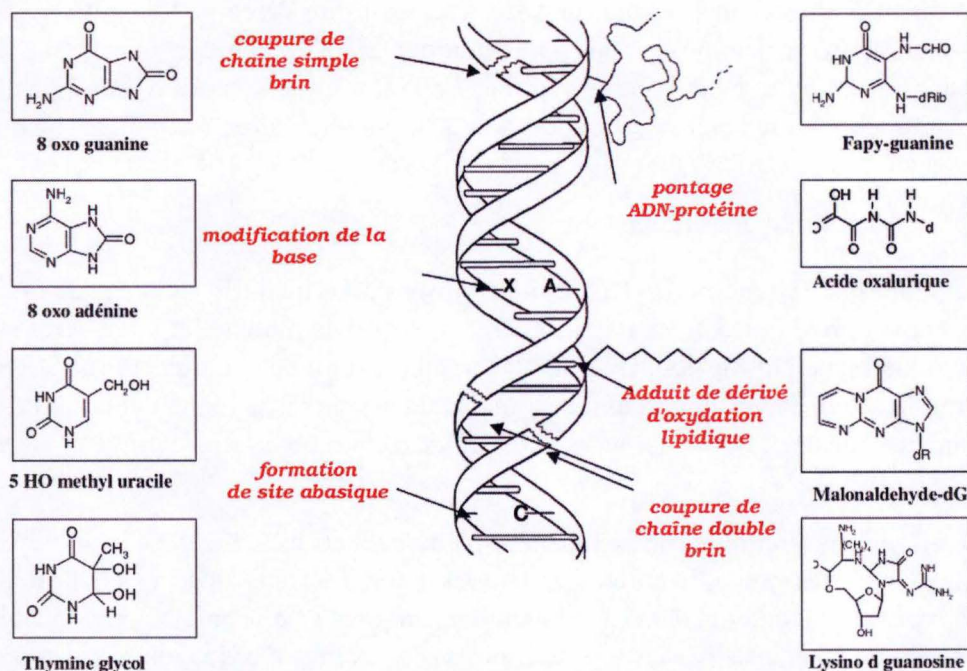


Figure 17 : Exemple de lésions de l'ADN formées par attaque radicalaires (Favier 2003).

1.3.3.2. Dommages des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants induisent deux types de dommages au niveau cellulaire, les dommages directs et les dommages indirects. Sans faire la distinction entre ces deux types de dommages, il est possible de quantifier les dommages induits par un gray sur une cellule (Fig. 15), 1 Gy induisant 40 DNA DSBs. La moitié des dommages sont des cassures simples brins (SSB pour Simple Strand Break) ou doubles brins (DSB pour Double Strand Break ; Ward 1988).

Les dommages directs ont une conséquence variable sur la survie de la cellule en fonction de l'énergie du rayonnement. Plus l'énergie de transfert est importante plus les dommages sont nombreux sur le trajet du rayon (Fig. 16). Des rayons de hautes énergies induisent des « clusters » de dommages, c'est-à-dire qu'il y a une forte concentration des dommages au passage du faisceau d'énergie. Des rayons de faibles énergies n'induisent pas ces « clusters » les dommages sont sur une zone plus importante autour du trajet du faisceau d'énergie.

Les dommages d'origines indirects sont dus quant à eux à l'ionisation de molécule d'eau (Ward 1988). Le processus d'ionisation induit la perte d'un électron dans une molécule d'eau créant ainsi un radical hydroxyle, cette molécule est un dérivé réactif de l'oxygène (ROS). Ces réactifs sont retrouvés naturellement dans les cellules, ils sont produits lors de la respiration aérobie et lors du processus de vieillissement. Afin de limiter le stress oxydatif produit par ces ROS, la cellule produit des antioxydants (Zelmann et al. 2010). Les radiations augmentent leur nombre par ce mécanisme d'ionisation de l'eau. Les conséquences d'une augmentation des ROS sont multiples et variées, l'une des conséquences principales est l'apparition de cassures au niveau des brins d'ADN, tant simples que doubles (Fig. 17). Les ROS peuvent induire en plus la disparition ou la modification de bases dans la séquence d'ADN (Wallace 1998; Favier 2003).

Malgré leur faible nombre lors d'une irradiation, les DNA DSBs ont été décrites comme la cause principale de la mort cellulaire (Sutherland et al. 2002). Il a été démontré que piéger les produits de la radiolyse de l'eau permet de diminuer la radiosensibilité de bactéries et de cellules de mammifères d'un facteur 3. Le nombre de dommages tel les SSBs, DSBs et les aberrations chromosomiques en sont aussi diminuées d'un même facteur (Ward 1988). Une hypothèse émise prévoit que les individus au state anhydrobiotique auraient une radiorésistance plus importante que les individus complètement hydratés car en état d'anhydrobiose, la quantité d'eau au sein des cellules est inférieure à 5% (Watanabe 2006). Par conséquence la radiolyse de l'eau devrait être moins fréquente n'engendrant que peu de ROS. Néanmoins, chez les tardigrades, les individus desséchés, tous comme les individus hydratés, sont décrits comme radio-résistants. Les individus hydratés et desséchés ont montré un taux de survie équivalant à celui des individus contrôles non exposés, pour des doses de 0.5 et 1 kGy. De plus, l'espèce *Richtersius coronifer* a une LD50 de 2500 Gy après 30 jours à l'état hydraté, et de 3000 Gy après 22h à l'état desséché (Harms-ringdahl et al. 2005). Ces résultats montrent que chez les tardigrades l'absence d'eau ne joue pas un rôle protecteur des ROS lors de la dessiccation.

Aucunes études comparables n'ont pour le moment étaient publiées chez les rotifères bdelloïdes.

Protein	Reference
PCNA	Montaner et al. [44]
Ku	Gueranger et al. [28]
RPA	Guyen et al. [45]; Wang et al. [82]
XRCC3	Girard et al. [83]
OGG-1	Bravard et al. [84]; Morreall et al. [85]
PARP-1	Ding et al. [86]
XPA	Grosskopf et al. [87]; Zhou et al. [88]
TFIIH(p44)	Fribourg et al. [89]
XPE	Grosskopf et al. [87]
APE1	Kelley et al. [90]

Figure 18 : Protéines de réparation de l'ADN connues pour être des cibles de l'oxydation (Karran & Brem 2016)

1.3.3.3. Résistances des rotifères bdelloïdes aux radiations ionisantes

Dans le cas des rotifères bdelloïdes, une étude a décrit une survie d'individus de l'espèce *A. vaga* desséchés après une irradiation à 9.000 Gy en utilisant du ^{137}Cs , source de rayonnement gamma (Krisko et al. 2012). Cette source a aussi été utilisée pour étudier les impacts des RI sur la reproduction d'*A. vaga* en état hydraté : il y a une diminution d'environ 90% de la fécondité après une irradiation à 1.120 Gy. Cette diminution est quant à elle visible après seulement une irradiation de 200 Gy sur l'espèce *Euchlanis dilatata*, un genre sœur des rotifères bdelloïdes, les rotifères monogononts (Gladyshev & Meselson 2008). Il a été observé une différence de survie lors d'une irradiation à une même dose mais avec des rayonnements d'énergies différents. Une irradiation à 2.000 Gy avec des rayonnements ayant une énergie d'environ 200 keV induit une survie de 50% chez des individus desséchés de l'espèce de rotifère bdelloïde *Mniobia russeola*. L'utilisation d'un rayonnement ayant une énergie plus faible, soit 2,2 keV entraîne une mortalité chez tous les individus (Jönsson & Wojcik 2017).

1.3.3.4. Les ultraviolets

Les ultraviolets ne sont pas considérés comme des radiations ionisantes, mais les dégâts induits par ces dernières ne peuvent pas être négligés. En 1992 le soleil est classé cancérigène par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer ; IARC 1992). Les UVs qui ont une faible longueur d'onde ont un effet biologique plus important que les UVs de grandes longueur d'onde (qui se rapproche donc de la lumière du visible). Ce sont les UV-C puis les UV-B qui sont donc les plus néfastes pour les cellules et pour l'ADN (Setlow 1974). Les UVs sont couramment utilisés pour effectuer des mutagénèses sur les bactéries afin de comprendre leur physiologie et leur virulence (Bose 2016). Les deux lésions principales induites par les UVs sont les dimères cyclobutyliques de pyrimidine (CPDs) et les photoproduits 6,4 (Rastogi et al. 2010; Karran & Brem 2016). Les CPDs ont pour conséquences d'inhiber la transcription des gènes et la réplication de l'ADN en empêchant la fixation des polymérases sur les brins d'ADN. Une autre conséquence des UVs est l'augmentation en ROS (Alscher et al. 1997; Rastogi et al. 2010). Les dommages induits par les ROS sur des protéines participant aux voies de réparation de l'ADN (Fig. 18) entraînent une diminution des réparations et provoquent le maintien de mutation dans le génome (Karran & Brem 2016). Des dommages indirects sont dès lors visibles lors des tentatives de réparation du génome. Il arrive que les produits initiaux (ex. les CPDs) des UVs soient transformés en DSBs durant la réplication de l'ADN (Rastogi et al. 2010). Des organismes ont mis aux points des systèmes afin de réduire les dégâts induits par ces UVs, par exemple la cyanobactérie *Nostoc commune* sécrète un pigment avant de rentrer dans un état de dessiccation qui a pour rôle d'absorber environ deux tiers de l'énergie émise par les UVs (Potts 1996).

1.3.3.5. Effets des UV-B sur les rotifères bdelloïdes

Dans les cas des UVs, les UV-C, les plus létaux, induisent une diminution de l'espérance de vie de *P. acuticornis*. Une irradiation de $170\mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ sur des individus hydratés diminue leur espérance de vie de deux semaines (Hussain 1975). Les UV-B induisent une diminution des capacités de reproduction d'individus de l'espèce *P. roseola* à l'état hydraté. Ces mêmes UV-B induisent des dommages de types CPDs, un cycle de dessiccation est nécessaire à la réparation de ces dommages (Fischer et al. 2013). Pour l'espèce *A. vaga*, malgré le peu de dommage théoriquement induits par les UV-A, à l'état desséchés ce type d'UV provoque une

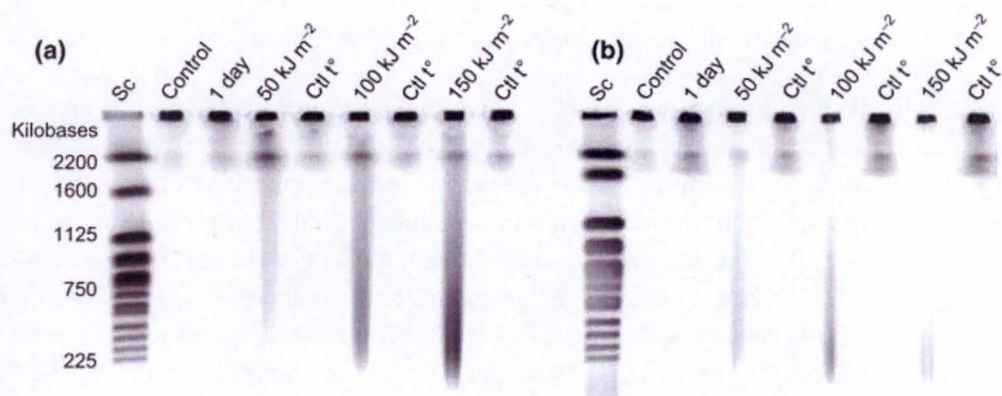


Figure 19 : Analyse par pulse-field gel electrophoresis (PFGE) des effets des UV-A (a) et des UV-B (b) sur l'intégrité du génome d'individus desséchés de un jour d'*A. vago*. La première ligne sur les gels correspond au caryotype de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Les autres lignes correspondent à 1.000 individus desséchés de un jour d'*A. vago* et exposées aux UV à des doses de 50, 100 et 150KJ. Pour chaque expériences, 1.000 individus d'*A. vago* ont été exposés à la même température (Ctl t°) pendant tout le temps des expositions (Hespeels et al., 2014).

diminution du taux de survie est cela dès une dose de 50kJ.m^{-2} avec une baisse d'environ 10%. A une dose équivalente, les UV-B induisent une diminution de 26% du taux de survie et ce taux de survie diminue à 11% lors d'une irradiation aux UV-B à une dose de 150kJ.m^{-2} . Cette même dose reçue lors d'une irradiation avec des UV-A ne réduit la survie que jusqu'à 38%, montrant ainsi qu'il existe bien une différence entre les UV-A et les UV-B sur l'incidence de la mortalité chez les organismes et dans notre cas chez *A. vaga* (Hespeels et al. 2014). Dans cette même étude, il a été décrit que les UV-B tout comme les UV-A engendraient une fragmentation du génome (Fig. 19).

1.3.4. Résistance à de très faibles pressions : le vide

Appréhender et conquérir le vide spatial est l'un des défis actuellement les plus importants dans la conquête spatiale. Les hommes ne peuvent surpasser ce milieu sans équipements de protection. Cependant plus de 70% des bactéries et champignons étudiés lors d'expériences spatiales ont la capacité de survivre à de courte période (jusqu'à 10 jours) dans le vide spatial sans protection (Baglioni et al. 2007). Comme chez *Bacillus subtilis* où un taux plus important de mutation génétique a pu être observé après une période de vide, ainsi que des DNA DSBs (Horneck 1993). Les dommages et modifications d'une période de vide, tant artificielle que naturelle, ressemblent aux dommages induits par une dessiccation (tel que les DNA DSBs ; Horneck 1993).

En 2007, les espèces de tardigrade *Richtersius coronifer* et *Milnesium tardigradum* furent les premiers animaux à être décrits comme résistant au vide spatial. Ces animaux furent exposés durant 10 jours dans le vide spatial à faible altitude (c.-à-d. environ à 400 km de la terre) pendant la mission FOTON-M3 en 2007 dans le cadre des missions scientifiques mises en place par l'agence spatiale européenne (Jönsson et al. 2008). Pour les deux espèces, il n'y a pas de différence significative entre la survie des conditions contrôles et des conditions ayant été exposé au vide. Dans le cas des rotifères bdelloïdes, une étude menée par Lapinski & Tunnacliffe (2003) a montré que des individus d'une espèce non identifiée ont été capables de survivre 51 jours à un vide artificiel d'une pression de 5,33 mbar (la pression atmosphérique terrestre est de 1013,25 mbar). L'espèce *M. quadricornifera* a été quant à elle la première espèce à survivre à une exposition dans le vide spatial de la stratosphère terrestre. Cette expérience menée par Caprioli en 2002 a été effectuée grâce à un ballon sonde qui est resté 20 heures à une distance de 40 km de la terre (la couche d'ozone s'arrête aux alentours des 40 km de distance). Des survivants sont observés, mais lors de cette exposition le vide n'était pas le seul paramètre. Les individus n'étaient pas protégés contre les rayonnements gamma, de neutrons et de ions lourds qui sont naturellement stoppés par la couche d'ozone, et contre les changements brutaux de température (Caprioli & Ricci 2002). Actuellement, aucune donnée relative à l'impact du vide, tant artificiel que spatial, n'ont été publiées sur l'espèce de rotifère *A. vaga*.

1.4. Mécanismes de résistance

1.4.1. Diversité des mécanismes de résistances

Au sein des cellules, il existe des mécanismes de défenses contre les stress. Dans le cas des dommages induits par les radiations plusieurs hypothèses existent pour expliquer la radorésistance. La première hypothèse serait que tout d'abord un grand nombre de copies du génome permettrait à l'individu de réparer les dégâts induits par les RI car il y a une plus grande

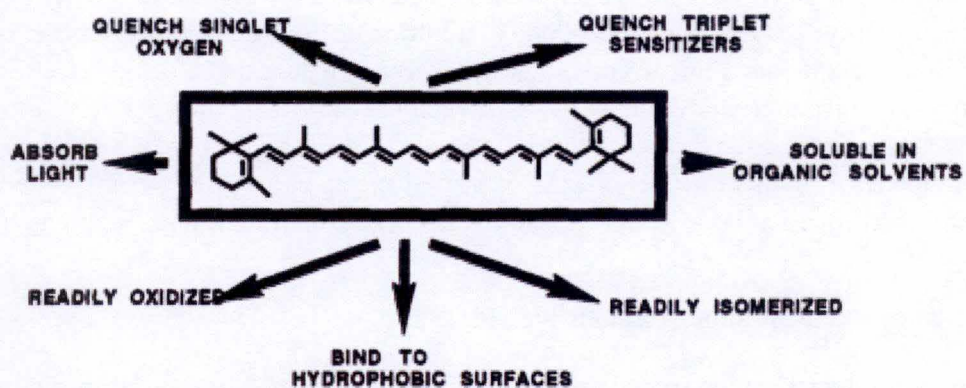


Figure 20 : Propriétés physiques et chimiques des caroténoïdes (Krinsky 1994)

probabilité d'avoir au moins une copie non endommagée. Cette hypothèse n'est pas confirmée étant donné qu'en comparant deux espèces de bactéries : *D. radiodurans* et *Micrococcus luteus*, qui contiennent le même nombre de copie de leur génome, l'on remarque que leur sensibilité aux radiations est différentes (Makarova et al. 2001). Néanmoins chez *D. radiodurans* les copies supplémentaires sont utilisées lors de la réparation des cassures double brins, par un mécanisme de réparation nommé ESDSA (Extended synthesis-dependent strand annealing) (Slade et al. 2009). L'étude sur la radiorésistance des bactéries : *D. radiodurans*, *Rubrobacter radiotolerans* et *Halobacterium salinarum* a permis de soulever une nouvelle hypothèse. Un point commun entre ces trois bactéries est la présence d'un caroténoïde prédominant de couleur rouge : la bactérioruberin (Asgarani et al. 1999; Asgarani et al. 2000). Les caroténoïdes participent à la capture de l'énergie lumineuse lors de la photosynthèse et protègent contre les effets d'oxydation (Fig. 20 ; Krinsky 1994). En se basant sur l'hypothèse que la bactérioruberin joue un rôle dans la résistance contre les RI, une étude a été menée sur la bactérie *H. salinarum*. Ils mesurèrent la dose de rayon gamma nécessaire pour induire la mort chez 63% des individus irradiés, soit une survie de 37% (c.-à-d. D₃₇) en présence ou en absence de bactérioruberin. Ils faisaient passer la dose de rayonnement de 5.2 Gy (pour les individus sans bactérioruberin) à 11,2 Gy (pour les individus avec bactérioruberin) pour arriver à la D₃₇ (Asgarani et al. 1999). Ce facteur de protection semble augmenter en fonction de la concentration de bactérioruberin dans la bactérie.

Les rotifères bdelloïdes sont aussi connus pour être radio-résistants dans l'état desséché (Jönsson & Wojcik 2017). Une hypothèse propose que cette radiorésistance pourrait venir des antioxydants. Ce système permettrait à cette espèce d'être plus résistante à l'action de carbonylation des protéines (dommage oxydatif impliquant la dégradation des protéines) induits par les ROS (Krisko et al. 2012).

1.4.2. Les sucres comme protection

Les sucres sont des réactifs importants dans le vie d'une cellule. Il a été décrit que des disaccharides avaient un rôle dans le maintien des structures phospholipidiques lors de la dessiccation. En effet une grande quantité de disaccharides peuvent être trouvés dans les cellules chez des organismes en état anhydrobiotique (Potts 1999; Watanabe 2006; Welnicz et al. 2011), et plus particulièrement le disaccharide tréhalose (deux α -glucose liés par une liaison $\alpha, \alpha-1, 1$). Son rôle serait de remplacer l'eau en formant des ponts hydrogènes avec les parties et atomes hydrophiles des protéines (Crowe et al. 1984; Carpenter et al. 1994). Il a été montré que le disaccharide tréhalose pouvait remplacer l'eau, mais il ne peut pas complètement remplacer cette dernière sur tous les interactions de type ponts hydrogènes. Certains organismes en ont même une importante quantité tel le nématode *Aphelenchus avenae* où ce disaccharide représente environ 20% de la masse sec de l'organisme en état de dessiccation (Watanabe 2006). Même si cette protéine semble être la clef de la résistance à la dessiccation, cette protéine ne semble pas jouer un rôle chez les rotifères bdelloïdes (Lapinski & Tunnacliffe 2003). Des gènes codants pour des enzymes de la voie de synthèse et de dégradation de la tréhalose ont été découverts en 2015 dans le génome de l'espèce *A. vaga* (Hespeels et al. 2015). La présence de tréhalose n'a pour le moment pas pu être détectée dans les cellules. Une hypothèse propose que le processus de catabolisme de ce disaccharide est plus efficace et rapide que le processus de synthèse. Il a aussi été discuté que le rôle du disaccharide et de son précurseur pourrait donc être celui de molécule de signalisation lors de l'entrée en dessiccation (Hespeels et al. 2015).

1.4.3. Les LEAs

Les protéines : « late embryogenesis abundant » (LEA) sont souvent associées au stress induit par la disparition de l'eau. A l'origine découvertes chez les plantes, des protéines homologues ont été retrouvées chez certaines bactéries et invertébrés (Tunnacliffe & Wise 2007; Hand et al. 2011). Elles jouent un rôle dans les processus de résistance à de nombreux stress en plus de la résistance au manque d'eau. Elles sont décrites dans la tolérance au froid, par ex. l'expression de cette protéine chez une levure permet d'augmenter d'un facteur de 3 leur survie après une congélation (Honjoh et al. 1999). Elles interviennent aussi dans la protection contre les chocs osmotiques chez la levure (Zhang et al. 2000). Lors de la déshydratation, les protéines LEAs changent de conformation. En présence d'eau, les protéines ont très peu de structure secondaires (ex : feuillets β et hélices α), mais plus le taux d'eau diminue dans la cellule plus sa conformation devient structurée. Il y a alors formation de deux hélices α en épingle à cheveux. Cette modification conformationnelle induit la baisse de la solubilité des protéines en milieu aqueux (Li & He 2009). Cette baisse de solubilité permet aux LEAs d'interagir avec les protéines se trouvant dans la cellule. Cette protéine semble donc plus stable dans une faible concentration d'eau, agissant alors comme une chaperonne ou comme un bouclier moléculaire contre la dessiccation, protégeant ainsi les protéines d'une agrégation ou d'une dénaturation due à un manque d'eau (Hand et al. 2011). Cette protection intervient aussi au niveau des membranes lors de la perte d'eau et d'un changement de phase. Une autre fonction donnée à ces protéines est celle de capteur d'ions, en effet via les acides aminés chargés des LEAs, il a été proposé que ces protéines puissent capter les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) lors de la dessiccation (Boschetti et al. 2011; Sharma et al. 2016).

1.4.4. Les HSPs

Les protéines de choc thermiques (HSPs) sont retrouvées dans la réponse cellulaire envers de nombreux stress (MacRae 2000; Welnicz et al. 2011; Sottile & Nadin 2017). Elles sont connues pour avoir un rôle de chaperonnes et pour participer à de nombreux processus cellulaires (ex : le repliement des protéines ; Sottile & Nadin 2017). Dans la même optique, certaines HSPs permettent de protéger les cellules lors d'une irradiation (Wu et al. 2017; Sottile & Nadin 2017). En particulier la famille des Hsp70, joue un rôle dans la protection contre les dommages oxydatifs. Des HSPs viennent se fixer à la protéine p53 qui est la « gardienne du génome » et qui permet de mettre en place le système de réparation de l'ADN une fois les dommages détectés (Williams & Schumacher 2016). Enfin, pour une espèce de fourmis une forte température entraîne une augmentation des HSPs au sein des cellules. A forte concentration elles permettent de protéger contre l'agrégation des protéines soumises à un stress thermique (Willot et al. 2017). Malgré leur nom, les HSPs interviennent dans un grand nombre de mécanismes de protection.

1.5. L'espace

L'espace est un des milieux les plus hostiles qui existent, il est défini par une raréfaction de la matière plus la hauteur est importante, arrivé aux environs de 100 km une ligne imaginaire sépare l'atmosphère terrestre de l'espace (la ligne de Kármán). L'espace est caractérisé par une absence quasi-totale de la matière, cette absence est l'un des facteurs d'hostilité de ce milieu. Ce sont uniquement les rayonnements qui traversent l'espace qui définissent la température ressentie, un objet à la lumière du soleil verra sa température augmenter et à l'inverse la

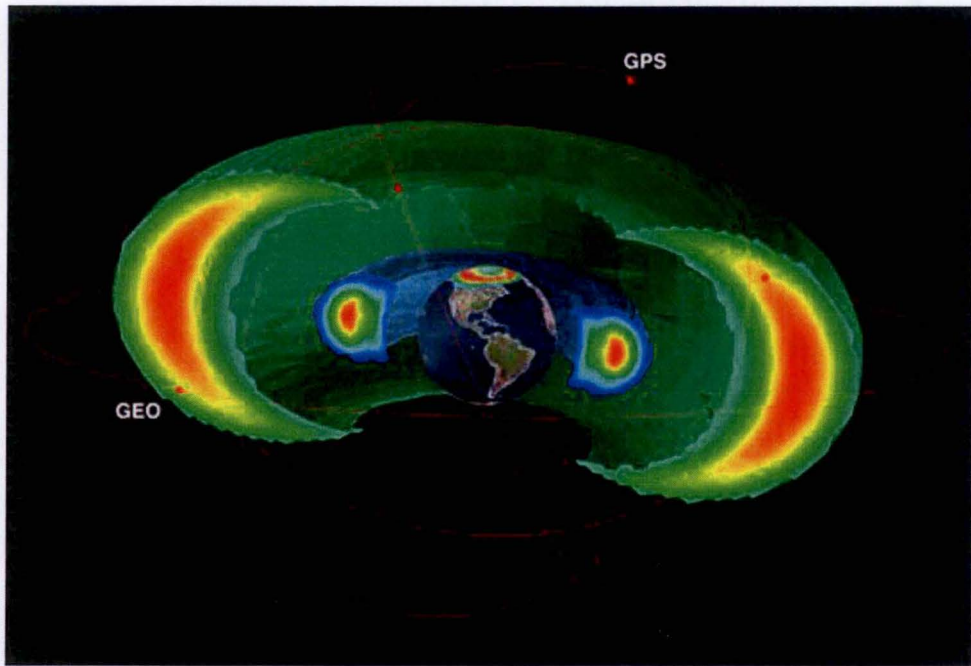


Figure 21 : Représentation des ceintures de van Allen. En vert la ceinture extérieure et en bleu la ceinture intérieure (insidegnss.com).

température d'un objet à l'ombre diminuera (sitn.hms.harvard.edu ; Baglioni et al. 2007). A l'inverse de la terre où ils existent d'autres sources de chaleurs (ex. le feu). Au niveau de la station spatiale internationale, des températures allant de 121°C à -157°C ont été mesurées (science.nasa.gov).

1.5.1. Les radiations spatiales

Plusieurs sources de radiations existent dans l'espace. Les radiations galactiques sont les plus vieilles, elles peuvent résulter de la création de l'univers et de l'explosions de supernovas. Les champs magnétiques solaire et terrestre et la couche d'ozone permettent de diminuer/ ont pour conséquence/ diminuent ces radiations, la dose annuelle reçue sur terre est de 0,30 mSv (Baglioni et al. 2007). Ces radiations consistent à/ sont constitués d'environ 2% d'électrons et 98% de protons et noyaux d'atomes, dans ces derniers eux même constitués de 1% de particules lourdes. Ce sont ces particules lourdes qui sont les plus dangereuses pour les êtres vivants, et qui sont la raison majeure de la recherche continue vers de meilleures protections physiques. Ces particules sont capables de traverser les protections utilisées sur les vaisseaux spatiaux et dans les combinaisons de protection (Baglioni et al. 2007). Dans le cas des radiations solaires il en existe deux sortes, les premières sont continues et de faibles intensités. Leur spectre d'émission est compris entre les radiations X et les fréquences radio. Les deuxièmes sont épisodiques, environ tous les 11 ans, et de courte durée, pas plus de quelques heures. Ce sont les éruptions solaires, leur énergie est plus importante du fait de leur composition importante en particules lourdes, en électrons et en particules alpha. Au cours de ces éruptions, il est possible de recevoir jusqu'à 10Gy de radiation, une dose dangereuse tant pour les composants électroniques que pour les êtres vivants (Baglioni et al. 2007).

Le spectre complet des radiations d'UV touche les objets présents dans l'espace. Les UV-C présentent tuent les spores de *B. subtilis* en quelques secondes. Ces dernières sont connues pour être jusqu'à 50 fois plus résistante aux UV-C que la plupart des spores (Setlow 2006). Lors d'une exposition au vide, il y a une modification conformationnelle de l'ADN, cette modification induit une augmentation importante de la sensibilité aux UVs (Baglioni et al. 2007).

1.5.2. Les différents espaces

L'espace peut être divisé en deux parties, l'orbite terrestre basse et l'espace interplanétaire, cette différenciation est obtenue grâce aux ceintures de van Allen. Ces ceintures forment un bouclier autour de la terre qui emprisonne les particules des radiations autour de la terre (Fig. 21). Ces 2 ceintures (une interne et une externe) sont formées par l'interaction entre les rayonnements galactiques, solaires et le champ magnétique terrestre, et emprisonnent les particules présentes dans les radiations. La première ceinture commence à environ 600 km de distance de la terre et la deuxième finit à 55.000 km de distance, mais il existe deux zones sur terre où leur protection est très faible, ce sont au niveau des pôles (Space Studies Board 2000; Baglioni et al. 2007; Thirsk et al. 2009). Les ceintures sont des zones dangereuses à traverser à cause de toutes les particules emprisonnées à l'intérieur. C'est dans l'orbite terrestre basse, sous la première ceinture que se trouve l'ISS à une distance d'environ 400km de la terre.

1.5.3. Le vide spatial

Le vide spatial est un espace considéré comme l'un des plus hostile, tant par la faible présence de matières que pour l'absence de gravité (www.esa.int). Cette absence de gravité est appelée

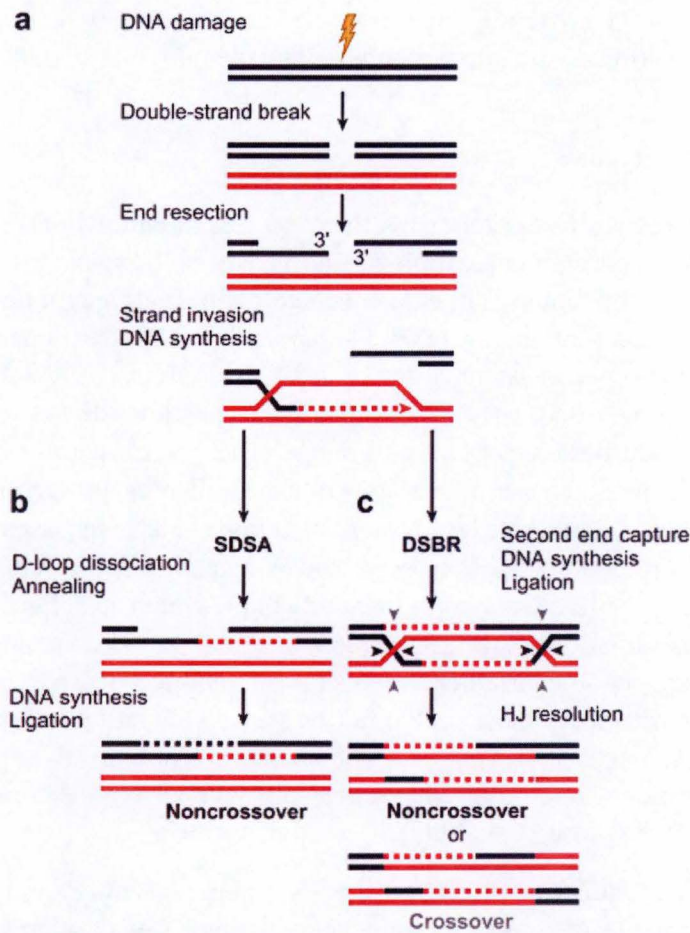


Figure 23 : Voie de réparation des DNA DSBs par HR. Les DSBs peuvent être réparées deux voies distingue de HR, la « synthesis-dependent strand annealing » (SDSA) et la « double-strand break repair » (DSBR). (a) Après formation d'une DSB, les extrémités de l'ADN endommagées sont transformées en simple brin pour devenir un site de fixation pour les protéines de la voie HR. (b) Dans le voie SDSA, la boucle D est déroulée et le brin néo-brin d'ADN s'hybride avec le simple brin qui est associé à l'autre extrémité de l'extrémité endommagée. Seuls des produits « Nocrossover » sont formés. (c) Dans la voie DSBR, la seconde extrémité DSB peut être capturée pour former une deuxième jonction d'Holliday (JH), accompagné d'une synthèse d'ADN et d'une ligature. La résolution des JH peut donner deux produits : « Noncrossover » (triangle noirs) et « Crossover » (triangles gris).
(San Filippo et al. 2008)

microgravité. Il a été observé que la microgravité a des effets sur les organismes, comme chez le rat où il est observé une diminution de la masse osseuse et musculaire avec une baisse du niveau d'expression de gènes impliqué dans l'oxydation des acides gras (Colleran et al. 2000; Stein et al. 2002). Ces résultats sont visible chez les humains lors des missions à bord de la l'ISS (Fitts et al. 2000).

Dans l'espace, on fait face à un manque d'oxygène et à une pression très basse, cela induit une impossibilité de respirer. Sans protection la différence de pression entre l'intérieur d'un être vivant et l'espace engendre ou engendrerait une fuite de l'oxygène contenue dans le corps de l'être vivant, et de tous les autres gaz présents. En 15 secondes le sang serait désoxygéné complètement et l'organisme tomberait dans l'inconscience et pourrait mourir dans les minutes suivante (sitn.hms.harvard.edu). Une observation de ce phénomène d'inconscience a eu lieu en 1965 au centre spatial de Johnson aux Etats-Unis sur un être humain. Par accident un technicien a dépressurisé sa combinaison dans une chambre sous vide, après environ 15 secondes il perdit connaissance. Sa combinaison fut de nouveau pressurisée 25 secondes la dépressurisation et il reprit connaissance environ 1 minute après l'accident. Son témoignage nous indique aussi que sa salive a commencée à bouillir sur sa langue, ce phénomène d'ébullition arrive quand la pression diminue (scientificamerican.com). Des expériences visant à connaître le temps maximal où un animal peut survivre au vide ont aussi été effectué. Des chimpanzés ont été exposés à des durées croissantes de vide, la durée de 2 minutes et 30 secondes est la durée d'exposition maximale où aucuns problèmes neurologiques n'ont été détectés plusieurs mois après l'expérience (Koestler 1965).

1.6. Réparation de l'ADN

Comme cité explicité précédemment, de nombreux stressés ont la particularité d'induire des dommages au sein du génome, dont des cassures au niveau des brins d'ADN. Ces cassures peuvent être soit simple (SSR) soit double (DSB). Etant donné que mon mémoire se focalise sur les mécanismes de réparation des DNA DSBs chez *A. vava*, cette partie va détailler les mécanismes de réparation décrits nous allons dans cette partie nous intéresser à deux voies de réparation des DSBs.

Les DSBs ont un impact sur l'intégrité du génome s'ils ne sont pas réparés, et donc peuvent conduire à une instabilité génomique et à la mort cellulaire (Ceccaldi et al. 2016). Une mauvaise réparation peut introduire des mutations (délétions, insertions) ou des translocations chromosomales pouvant induire des instabilités génomique et des mutations oncogéniques comme (Aparicio et al. 2014; Nickoloff 2017; Shibata 2017). Dans ces cas de défauts de réparation l'intégrité chimique de l'ADN est réparée mais l'information génétique qu'elle contient n'a pas été fidèlement reconstruit.

Il a été décrit deux voies majeures de réparation de l'ADN : la voie de recombinaison homologue (HR) et la voie de jonction des extrémités non homologues (NHEJ). Dans la première voie (HR), le mécanisme est un mécanisme conservateur de l'intégrité de l'information génétique du brin d'ADN endommagé. Quant à la deuxième voie, le mécanisme peut être moins précis dans la conservation des informations génétique du fait de son processus de réparation qui consiste à liguer directement deux morceaux d'ADN cassés ensemble. Ce mécanisme peut engendrer une perte de nucléotides et de l'intégrité génomique (Thompson & Schild 2001; Weterings & Chen 2008). Actuellement la répartition de ces deux mécanismes dans la réparation des DSBs n'est pas clairement connue (Shibata 2017).

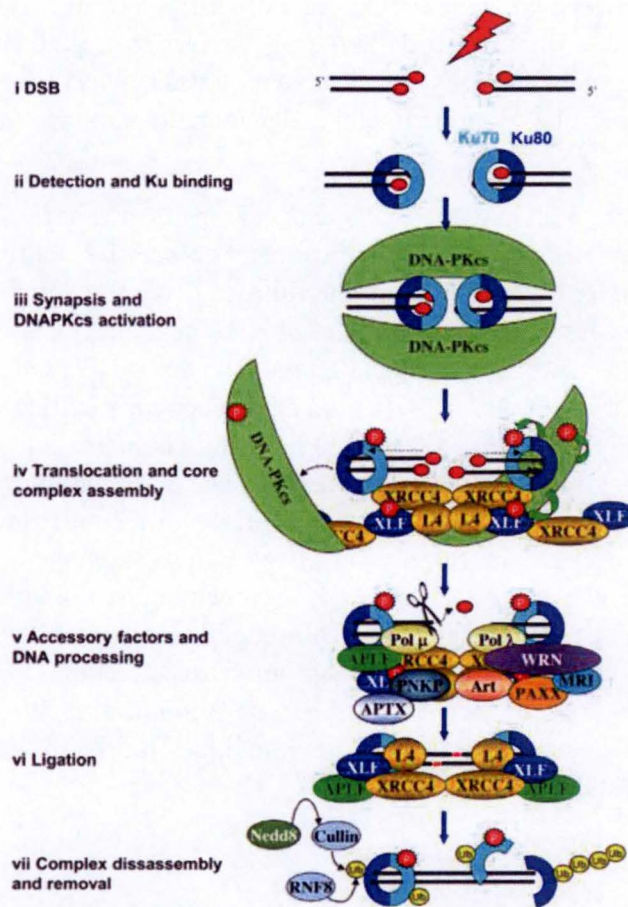


Figure 24 : Etapes de la voie NHEJ. i : Apparition d'une DNA DSB. Les extrémités sont souvent modifiées chimiquement (cercles rouge). ii : L'hétérodimère Ku70/Ku80 glisse sur les extrémités endommagées. iii : Les protéines DNA-PKcs sont recrutées et forment une synapse autour de la DNA DSBs. iv : Phosphorylation des DNA-PKcs et recrutement du complexe XRCC4-LIG-XLF. v : Des protéines accessoires sont recrutés pour stabiliser le complexe et modifier les extrémités de la DNA DSBs. vi : La Ligase 4 catalyse la ligation des extrémités. vii : Le complexe Ku doit subir une ubiquitination par les protéines Cullin et RNF8 pour être enlevé. (Rulten & Grundy 2017)

1.6.1. La réparation homologue

La voie de réparation homologue (HR) est primordiale dans la préservation des fourches de réplication, de la maintenance des télomères et dans la ségrégation des chromosomes lors de la méiose. Elle permet d'être garante de l'intégrité du génome et de limiter l'apparition de mutations (San Filippo et al. 2008). Une enzyme tient le rôle primordial, *Rad51*, cette recombinase a pour fonction de catalyser les réactions d'appariement des séquences d'ADN homologues. Cette recombinase est nécessaire lors des événements de recombinaison homologue mitotiques et de recombinaison homologue méiotiques. Il existe une deuxième recombinase, *Dmc1*, mais qui n'est active que lors de la méiose (San Filippo et al. 2008).

La voie HR peut être séparée en trois phases qui agissent successivement (Fig. 23). En premier la phase pré-synaptique, il y a une initiation du mécanisme HR par la détection d'un DNA DSB (ou d'une cassure simple brin) par le complexe MRN. Un complexe de 3 nucléases (Exo1, Dna2 et Sae2/CtIP) et d'une hélicase (Sgs1/BLM) sont recrutés afin de préparer le site de cassure, les extrémités cohésives devant finir par un groupement hydroxyle sur le 3'. A l'issue de cette préparation, la fixation de la protéine de réplication A (*RPA*) permet de retirer les structures secondaires du brin d'ADN afin de créer un site de fixation pour *Rad51*. La phase suivante, la phase synaptique, les filaments formés du brin d'ADN et des *Rad51* qui y sont fixés, partent à la recherche du brin d'ADN homologue. Une fois celui-ci trouvé, il y a la formation d'une boucle-D intermédiaire, puis la formation d'une ou de deux jonctions d'Holliday et pour finir de la fixation de *Rad54*. La dernière phase dite post-synaptique permet la synthèse de l'ADN complémentaire par la résolution de la ou des jonctions d'Holliday, cette résolution peut être effectuée de plusieurs manières (Fig. 23). S'il n'y a qu'une jonction d'Holliday, il en résulte des produits dits « Noncrossover » : le brin d'ADN complémentaire utilisé ne subit pas d'événements de crossing-over. Dans le deuxième cas, la résolution des deux jonctions d'Holliday peut engendrer des produits dits « Noncrossover » et des produits dits « Crossover ». Ces derniers ont subi un double crossing-over (San Filippo et al. 2008; Heyer et al. 2009).

1.6.2. La réparation de jonction des extrémités non homologues

Le mécanisme de la voie de jonction des extrémités non homologues (NHEJ) est aussi utilisé pour la recombinaison de type V(D)J dans le développement des cellules T et B et des anticorps du système immunitaire (Williams et al. 2014). Comme la voie HR, la voie NHEJ permet d'assurer l'intégrité chimique du génome (Weterings & Chen 2008). Il est possible de décrire ce mécanisme en trois phases (Fig. 24) : la capture des deux parties terminales des molécules d'ADN cassées, la formation d'un pont entre les deux parties terminales puis la ligation (Weterings & Chen 2008; Williams et al. 2014). Lors de ces trois phases de nombreux acteurs interviennent (Rulten & Grundy 2017). Lors de la phase de capture, la cassure est reconnue par l'hétérodimère Ku70/Ku80 (complexe Ku) qui a une très haute affinité avec les parties terminales engendrées par les DSBs. La conformation quaternaire du complexe Ku contient un disque vide en son centre qui lui permet de prendre place autour de l'hélice d'ADN. Son rôle est double, inhiber les autres voies de réparation de l'ADN et recruter les protéines « DNA-dependent protein kinase catalytic subunit » ou DNA-PKCs. Ces protéines permettent de faire le pont reliant les deux molécules d'ADN ayant le complexe Ku au niveau de leur partie terminale. L'autophosphorylation des protéines DNA-PKCs, ainsi que leur phosphorylation induite par la protéine ATM engendre une modification conformationnelle. Cette conformation permet aux parties terminales de l'ADN d'être accessible à d'autres facteurs de la voie NHEJ.

Les protéines ARTEMIS viennent préparer les parties terminales de l'ADN pour le recrutement des polymérase μ et λ . Ces polymérase synthétisent des nucléotides afin de pouvoir lier les deux morceaux d'ADN. C'est lors de cette phase que le mécanisme NHEJ est le plus enclin à engendrer des pertes de nucléotides et donc d'information génétique. Par la suite un complexe vient effectuer la ligation entre les deux extrémités, ce complexe est composé principalement des protéines XRCC4, Ligase 4 et XLF. Pour finir, le complexe Ku est dégradé afin d'être séparé de l'hélice d'ADN réparée. Cette dégradation intervient grâce à une ubiquitination de ce complexe (Postow et al. 2008)

1.7. Objectifs du mémoire

Les rotifères bdelloïdes survivent à la dessiccation, à des hautes doses d'irradiations, à d'importantes températures et à des périodes de vide. Ils sont par ailleurs capables de réparer les cassures double brins suite à de longues périodes de dessiccation ou induits par protons. C'est en se basant sur ces données de la littérature que deux objectifs principaux ont été au cœur de mon mémoire.

Le premier a été de quantifier les résistances extrêmes du rotifère bdelloïde *Adineta vaga* en lien avec les facteurs stressants identifiés dans l'espace. Le but de cette caractérisation est de vérifier si cette espèce de rotifère bdelloïde est en effet un bon modèle biologique pour la recherche spatiale. Les résistances étudiées sont diverses et variées, incluant dans ce mémoire les températures extrêmes chez des individus en état de dessiccation ou hydraté, le vide spatial et les rayons UVs. Un objectif sous-jacent de ce mémoire est d'étudier les dégâts induits par ces différents stress. L'étude de la radiation ionisante a été effectuée dans le mémoire de Christophe ANTOINE, en collaboration avec Boris HESPEELS.

Le deuxième objectif est de déterminer quels sont les mécanismes de réparation en jeu lors de l'induction de cassures double brins pendant la dessiccation et l'irradiation. Une étude du niveau d'expression des ARNm de certains gènes de la voie NHEJ ont été analysés en lien avec une étude transcriptomique effectuée lors dans la thèse de Boris Hespels. Le but est d'étudier les modifications de l'expression de gènes avant, pendant et juste après une période dessiccation et radiation.

2	Résultats	22
2.1.	L'impact du vide sur la survie d'individus desséchés	22
2.1.1.	Impact sur la survie d'une courte période de vide et de lyophilisation	22
2.1.2.	Impact de cycles de pressions sur la survie	22
2.1.3.	Aperçu sur la survie d'une pré-réhydratation	22
2.1.4.	Impact de la pré-réhydratation lors de longues expositions	23
2.2.	L'impact de températures élevées sur la survie et la reproduction d'<i>A. vaga</i> desséchés	24
2.2.1.	Aperçu de la résistance à un large spectre de températures positives	24
2.2.2.	Cinétique de survie et reproduction d' <i>A. vaga</i> à une température de 65°C	24
2.2.3.	Impact de la vitesse d'augmentation de la température	25
2.3.	Impact des UV-B sur la survie d'individus <i>A. vaga</i> desséchés	26
2.3.1.	Impact de la température sur la survie suite à une irradiation aux UV-B	26
2.3.2.	Impact des rayons UV-B	26
2.4.	L'impact des températures basses sur la survie et la reproduction d'individus <i>A. vaga</i> hydratés	55
2.5.	Les modifications d'expressions de gènes suite à la dessiccation et irradiation	29
2.5.1.	Expression de gènes de réparation de l'ADN après une période de dessiccation	29
2.5.2.	Expression de gènes de réparation de l'ADN après irradiation au rayon X	32
26	Impact du vide sur l'intégrité du génome d'<i>A. vaga</i>	34

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés
après lyophilisation et exposition dans le vide

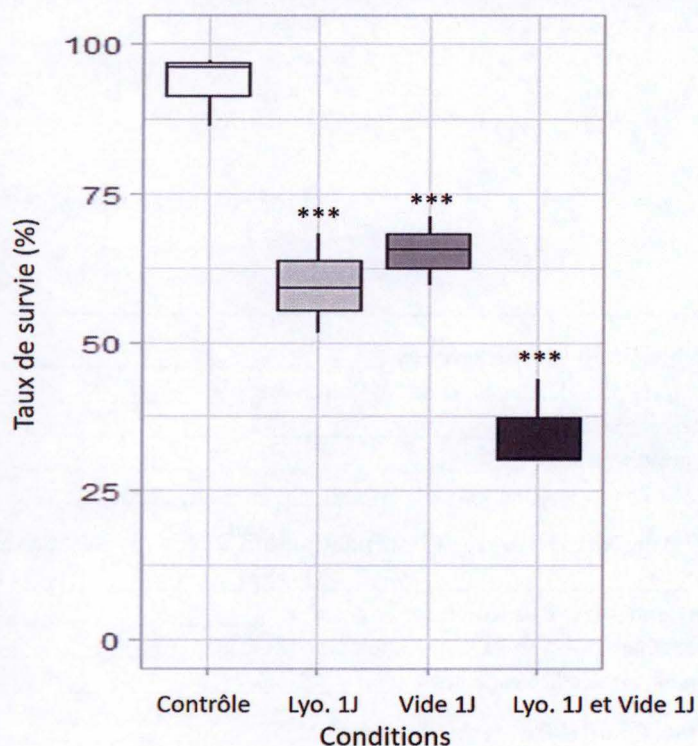


Figure 25 : Effet de la lyophilisation et du vide sur le taux de survie d'individus *A. vaga* desséchés un jour. L'effet du vide, de la lyophilisation et de la combinaison des deux a été mesuré sur des individus desséchés. Les individus desséchés contrôles ont été gardés à -80°C pendant toute une nuit avant de mesurer leur survie. ($n = 3$; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$)

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés
après des cycles de pression

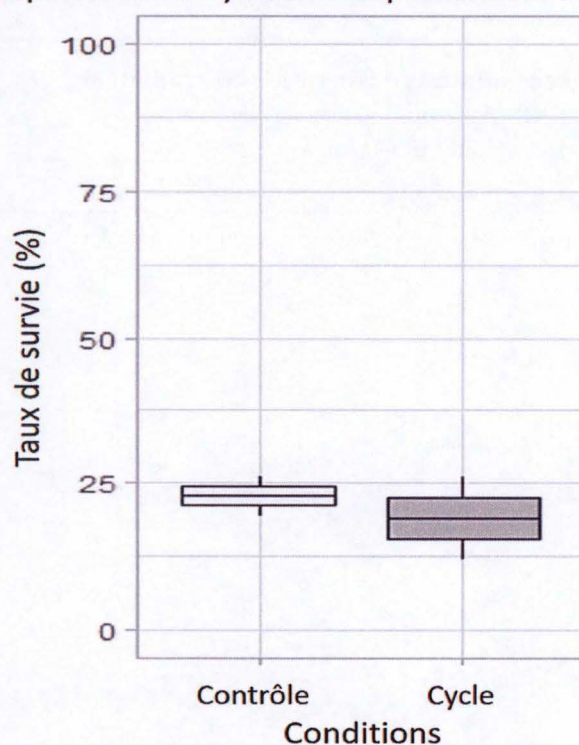


Figure 26 : Effet de cycles de pressions sur la survie d'individus d'*A. vaga* desséchés un jour. Des individus desséchés ont été soumis à un cycle quotidien de dépressurisation/pressurisation pendant les 5 premiers jours d'une exposition au vide d'une durée de 6 jours. Les individus desséchés contrôle ont été maintenus au vide de façon continue pendant 6 jours. ($n = 3$)

2 Résultats

2.1. L'impact du vide sur la survie d'individus desséchés

2.1.1. Impact sur la survie d'une courte période de vide et de lyophilisation

La résistance au vide du rotifère bdelloïde *A. vaga* a été évaluée lors de ce mémoire. Ces expériences contribuent à la caractérisation de la résistance extrême des bdelloïdes. Ce travail s'inscrit dans la procédure de validation de l'utilisation des rotifères bdelloïdes comme modèle à l'exposition de l'environnement spatial.

Un groupe de rotifères *A. vaga*, desséchés suivant le protocole de Hespeels et al. (2014), a été exposé à une période de vide d'un jour (pression de 10^{-6} mbar). Un deuxième groupe subi un processus de lyophilisation et un dernier groupe a été exposé à un jour de vide après avoir subi un processus de lyophilisation. Pour être lyophilisés, les échantillons doivent être congelés à une température de -80°C avant le processus de lyophilisation. La lyophilisation est un processus qui utilise le vide afin d'enlever les molécules d'eau. La survie contrôle est réalisée sur des individus desséchés un jour et stocké à -80°C pendant une nuit. Pour chaque condition, la survie a été effectuée trois fois.

Après réhydratation, la survie des individus contrôles était de $93,25 \pm 6,05\%$ (Fig. 25). Après un jour de vide la survie des individus réhydratés a diminué à $65,34 \pm 5,77\%$. La survie du groupe d'individus desséchés ayant été lyophilisé était de $59,58 \pm 8,37\%$. Et pour le groupe exposé 1 jour à la lyophilisation puis 1 jour au vide une survie de $34,84 \pm 7,82\%$ est observée.

2.1.2. Impact de cycles de pressions sur la survie

Les échantillons ayant été lyophilisés avant d'être exposé au vide on subit au total deux exposition au vide. Cela pose une question : est-ce que la survie diminue à cause du vide ou à cause de la répétition d'une modification de la pression. Nous avons testé cette hypothèse de la manière suivante, pendant les 5 premiers jours d'une exposition d'une semaine au vide, un cycle de modification de la pression était effectué chaque matin. Un cycle consiste en un retour à pression atmosphérique normale pendant une courte durée de temps avant d'exposer à nouveau les échantillons au vide. Les individus contrôles ont été gardés continuellement dans le vide pendant toute la durée de l'expérience. Cette expérience a été effectuée en triplicat (Fig. 26).

Après réhydratation, la survie des individus contrôles était de $20,4 \pm 10,06\%$. Une survie de $18,9 \pm 7,06\%$ est observée chez les individus ayant été exposé à la modification quotidienne de la pression.

2.1.3. Aperçu sur la survie d'une pré-réhydratation

Après un passage dans la chambre à vide, les échantillons desséchés semblaient plus fragiles que les échantillons contrôles (échantillons n'ayant pas été exposés au vide ; observation personnelle) suggérant une déshydratation accrue des échantillons étudiés. Précédemment, il avait été mis en évidence qu'une exposition d'œufs desséchés d'*A. vaga* à de forte concentration d'humidité relative pouvait améliorer le taux de survie après réhydratation. L'impact d'une élévation de l'humidité avant la réhydratation des échantillons exposés six jours au vide, via une exposition à une atmosphère contenant une humidité relative (HR) de 60 ou 90%, a été testé. La réhydratation a été effectuée après des périodes d'acclimatation de 6 et 24 heures à des humidités élevées. Les individus « contrôles SPR » ont été réhydratés sans cette pré-réhydratation (SPR). Des triplicats ont été effectués lors de cette expérience.

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés après 6 jours dans le vide en fonction du taux d'humidité pré-réhydratation

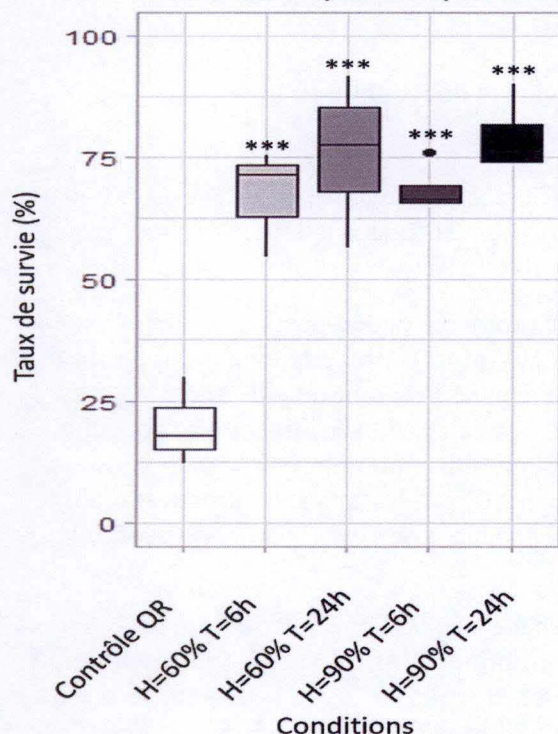


Figure 27 : Effet de périodes de pré-réhydratation sur la survie d'individus d'*A. vaga* desséchés un jour. Des individus desséchés ont été exposés pendant 6 jours au vide puis ont eu une période d'acclimatation à une humidité relative (HR) spécifique avant une réhydratation. H=60% T=6h : Période d'acclimatation de 6 heures à 60% d'HR ; H=60% T=24h : Période d'acclimatation de 24 heures à 60% d'HR ; H=90% T=6h : Période d'acclimatation de 6 heures à 90% d'HR ; H=90% T=24h : Période d'acclimatation de 6 heures à 60% d'HR. Les individus contrôles n'ont pas eu de pré-réhydratation. (n=3 ; *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001)

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés après pré-réhydratation et une exposition de 14 jours et 2 mois dans le vide

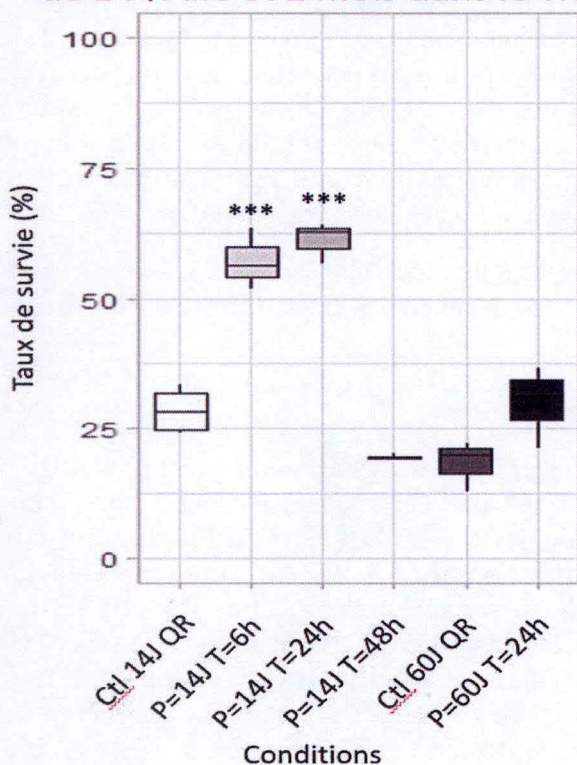


Figure 28 : Effet de périodes de pré-réhydratation sur la survie d'individus d'*A. vaga* desséchés un jour. Des individus desséchés ont été exposés pendant 14 et 60 jours au vide puis ont eu une période d'acclimatation à une humidité relative (HR) spécifique de 90% avant une réhydratation. P : période ; J : jours ; T : durée de la période d'acclimatation. Les groupes contrôles n'ont pas eu de pré-réhydratation. (n = 3 ; *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001)

Les individus contrôles ont un taux de survie de $20 \pm 5,83\%$ après cette période de 6 jours au vide (Fig. 27). Pour les individus ayant eu une exposition à 60% HR avant réhydratation, le taux de survie est de $67,1 \pm 9,07\%$ après une période d'acclimatation de 6 heures et de $68,5 \pm 3,73\%$ pour une période de 24 heures. Lors des périodes d'acclimations à 90% RH, la survie est de $75,8 \pm 11,17\%$ après 6 heures et de $79,2 \pm 5,52\%$ après 24 heures.

2.1.4. Impact de la pré-réhydratation lors de longues expositions

Lors d'une seconde expérience, des temps d'expositions au vide plus long ont été testés : 14 jours et 2 mois. Pour ce deuxième test, trois temps de pré-réhydratation à des RH de 90 % ont été testés pour la durée d'exposition de 14 jours : 6, 24 et 48 heures. Les individus exposés deux mois au vide ont eu une période d'acclimatation de 24 heures. Les individus contrôles ont été réhydratés sans pré-réhydratation. La survie a été évaluée trois fois par conditions.

Il en résulte une survie moyenne de $28,4 \pm 3,91\%$ pour les individus contrôles après une exposition de 14 jours (Fig. 28). Ce taux de survie augmente pour les périodes d'acclimatation de 6 heures et 24 heures, avec respectivement $57,2 \pm 4,19\%$ et $61,1 \pm 2,96\%$ de survie. Nous observons une importante diminution de cette survie pour les individus ayant eu une période d'acclimatation de 48 heures, avec une survie de 19,5%. Après une exposition de 2 mois, les individus contrôles ont une survie de $18,42 \pm 3,65\%$. La période d'acclimatation entraîne une augmentation de la survie à $29,97 \pm 5,84\%$.

Température	Temps d'exposition	Premier individu actif			
		1 jour	7 jours	14 jours	21 jours
21°C	2h	V	V	V	V
	66h	V	V	V	V
56°C	2h	V	V	V	V
	4h	V	V	V	V
65°C	2h	V	V	V	V
	66h		V	V	V
75°C	2h				V
	66h				
100°C	2h				

Tableau 3 : Survie d'*A. vaga* desséchés exposés à différentes températures et temps d'exposition. La survie est estimée après la réhydratation et est observée sous un microscope binoculaire. La température contrôle est de 21°C, les autres températures testées sont 56, 65, 75 et 100°C, les temps d'expositions vont de 2h à 66h et les observations sont effectuées après 1, 7, 14 et 21 jours. La lettre « V » indique la présence d'au moins un individu active. Nombre de répliques : 2 ou 3.

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés
après une exposition à 65°C

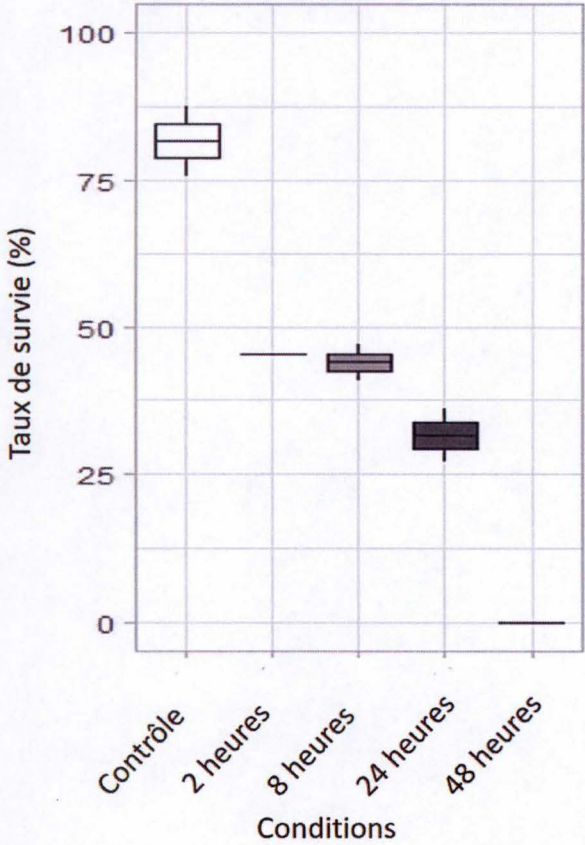


Figure 29 : Impact de la température 65°C sur la survie s'individus *A. vaga* desséchés un jour. Les bdelloïdes ont été exposés pendant 2, 8, 24 et 48 heures à 65°C. Les individus contrôles ont été gardés 48 heures à 21°C.

2.2. L'impact de températures élevées sur la survie et la reproduction d'*A. vaga* desséchés

2.2.1. Aperçu de la résistance à un large spectre de températures positives

L'espace est un milieu où les variations de températures sont fréquentes et peuvent être brutales. C'est dans cette optique que nous nous sommes intéressés à la tolérance à un large spectre de températures positives. Pour cela des individus d'*A. vaga* desséchés ont été exposés pendant des durées variables à de fortes températures (Tableau 3).

Des individus *A. vaga* desséchés ont été soumis à des températures allant de 21°C à 100°C pendant des durées allant de 2 heures à 66 heures. Après les expositions, les individus ont été réhydratés immédiatement. Nous avons défini l'instant « Premier individu actif » comme le moment où il est possible de voir au moins un individu *A. vaga* vivant lors des observations après 1 jour, 1, 2 et 3 semaines post-hydratation. La condition contrôle consiste en des individus fraîchement desséchés gardés à 21°C pendant des durées de 2 et 66 heures. Ces contrôles ont été effectués en duplicata, comme l'intégralité des expositions.

La présence d'individus actifs a été observée un jour post-hydratation dans le cas des expositions des groupes contrôles (les premiers mouvements sont observés dans les 15 min après réhydratation, observations personnelles). Dans le cas des expositions aux différentes températures, des individus actifs ont aussi été observés 1 jour post-hydratation pour les conditions 56°C et 65°C pour des durées d'exposition de 2 heures, et 4h à 56°C. Le premier individu actif après une exposition de 66h à 65°C est visible 1 semaine post-hydratation. Et le premier individu actif après un stress de 2h à 75°C a été observé 3 semaines post-hydratation. Dans les cas des expositions de 66h à 75°C ou 2h à 100°C, aucun rotifère vivant n'a pu être observé après réhydratation. Tous les individus sont morts après 66h à 75°C et après 2h à 100°C.

2.2.2. Cinétique de survie et reproduction d'*A. vaga* à une température de 65°C

La température de 65°C est la température la plus haute où les individus fraîchement desséchés d'*A. vaga* sont actifs après une réhydratation d'un jour. Cette température a été choisie afin d'étudier l'évolution du taux de survie et de la reproduction d'individus *A. vaga* fraîchement desséchés pendant une exposition de 48 heures. Une cinétique a été effectuée avec comme temps d'exposition : 2, 8, 24 et 48 heures. Les trois répliques des individus fraîchement desséchés contrôles ont été gardés pendant 48 heures à 21°C et à 40% d'humidité relative. Tous les points de contrôles ont été effectués en triplicata.

Après réhydratation, la survie moyenne observée est de $81,63 \pm 8,30\%$ chez les individus contrôles (Fig. 29). Une exposition de 2 heures à 65°C diminue la survie vers 45,41%. Pour des expositions de 8 et 24 heures la survie observée est respectivement de $43,98 \pm 4,56\%$ et $31,48 \pm 6,18\%$. Après une exposition de 48 heures la survie est de $0,08 \pm 0,00\%$.

Nous avons voulu savoir si une exposition à des températures élevées pouvait avoir un impact sur la fertilité des individus exposés. Pour chacune des 5 conditions précédentes, la capacité de reproduction des individus réhydratés a été évaluée (voir M&M). En condition normale, sans exposition à une température de 65 °C, des rotifères desséchés un jour ont une fertilité de 95%. Suite à une exposition de 2 heures à 65°C la fertilité diminue à 88,54%. Pour une exposition de 8 heures, il est observé une fertilité de 96,67%. Après des expositions de 24 et 48 heures, tous les individus isolés ont donnés une nouvelle colonie.

Fertilité d'*A. vaga* desséchés après une exposition à 65°C

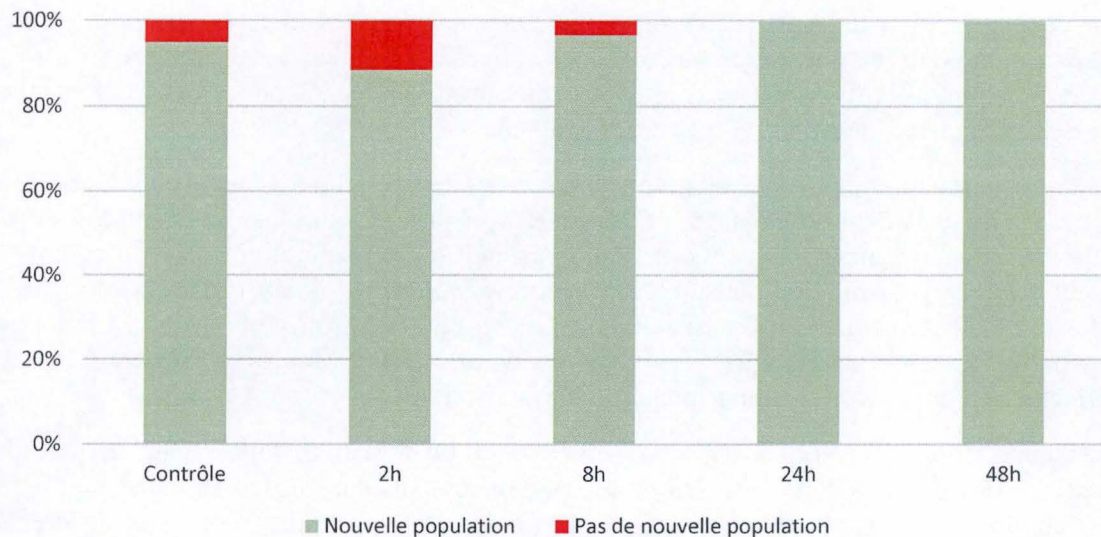


Figure 30 : Impact de la température 65°C sur la fertilité sur individus *A. vaga* desséchés un jour. Les bdelloïdes ont été exposés pendant 2, 8, 24 et 48 heures à 65°C. Les individus contrôles ont été gardés 48 heures à 21°C. Leur capacité de reproduction a été estimée pour les périodes de 2, 8, 24 et 48 heures à 65°C et des individus contrôles en isolant de façon aléatoire 120 individus vivants. La reproduction a été évaluée par une observation directe de la présence de nouveaux individus sous microscope binoculaire 14 jours après l'isolation.

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés après une montée graduelle de la température

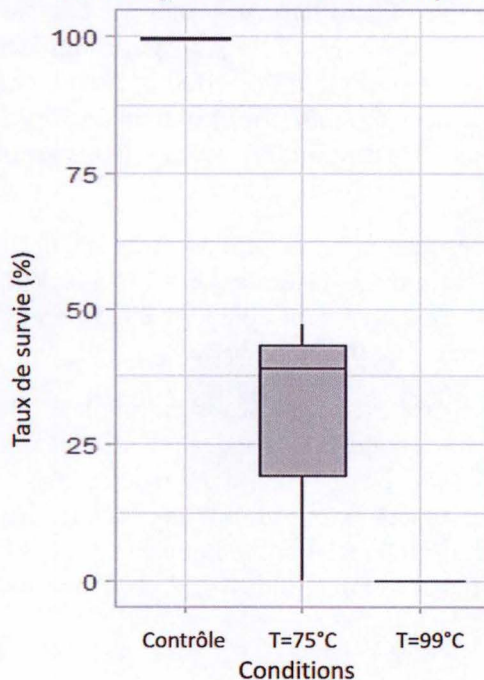


Fig. 31 : Impact d'une augmentation linéaire de la température de 1°C par minute sur la survie d'individus d'*A. vaga* desséchés. Des individus fraîchement desséchés ont été exposés à une augmentation de la température de 21°C à 75 et 99°C. Les contrôles ont été gardés durant toute la durée de l'expérience à 21°C avant de mesurer le taux de survie. (n = 3)

2.2.3. Impact de la vitesse d'augmentation de la température

Comme discuté précédemment (voir introduction) la vitesse d'augmentation de la température est susceptible d'affecter la survie des bdelloïdes exposés à des températures élevées. Nous avons observé la survie d'individus desséchés après une exposition à une augmentation linéaire ($1^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) de la température de 21°C à 75°C ou 99°C . Les trois répliques du groupe contrôle ont été gardés à 21°C pendant toute la durée de l'expérience (Fig. 30).

Les résultats suivants ont été obtenus. Les individus contrôles ont une survie de $99,6 \pm 0,08\%$, la survie a baissé vers $28,6 \pm 25,13\%$ pour les individus qui ont été exposés à une augmentation de la température jusqu'à 75°C . Une exposition jusqu'à 99°C entraîne une baisse de la survie à $0 \pm 0,00\%$, même après une observation trois semaines post-réhydratation.

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés exposés à une dose de 15J.cm^{-2} d'UV-B et à l'effet de la chaleur

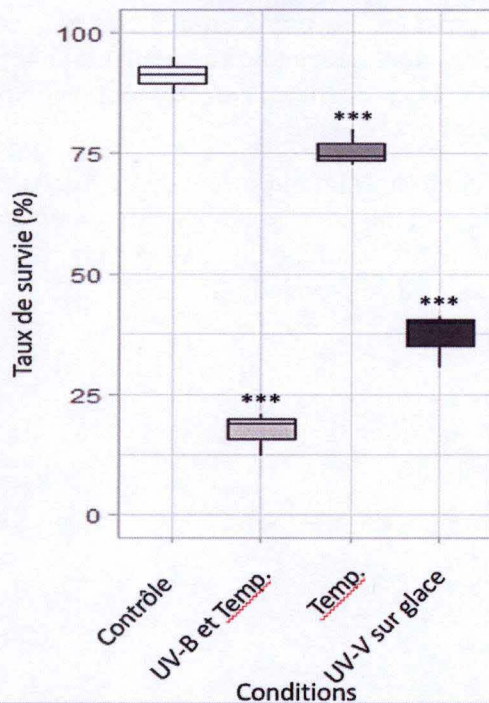


Figure 32 : Impact d'une irradiation avec un rayonnement monochromatique d'UV-B ($\lambda=512\text{nm}$) et de la température induite par les UVs sur le taux de survie d'individus d'*A. vaga* desséchés depuis 1 jour. Les individus « contrôle » ont été gardés à 4°C pendant toute la durée de l'expérience. ($n = 3$; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$)

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés exposés à une dose de 25J.cm^{-2} d'UV-B

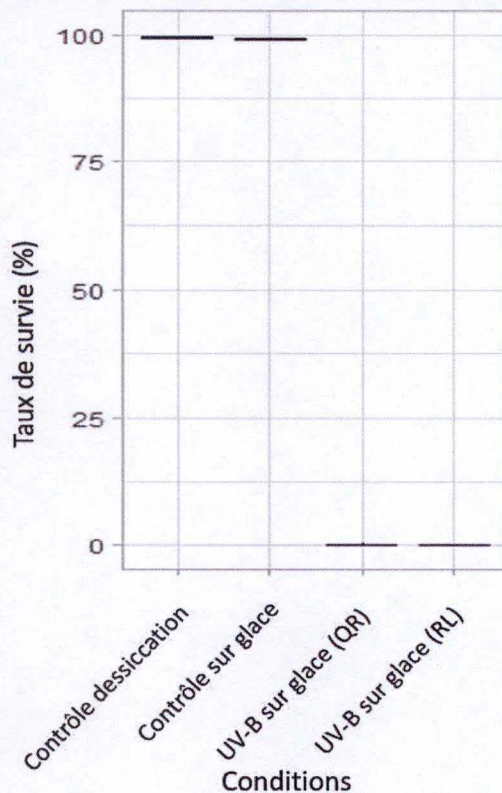


Figure 33 : Impact d'une irradiation avec un rayonnement monochromatique d'UV-B ($\lambda=512\text{nm}$) sur le taux de survie d'individus d'*A. vaga* desséchés depuis 1 jour. Les individus « contrôle dessiccation » sont des individus réhydratés après le jour de dessiccation. Les individus « contrôle sur glace » ont été placés sur glace sans recevoir les rayons UV-B pendant toute la durée de l'expérience. Le groupe « UV-B sur glace (QR) » a été réhydraté de façon dite classique. Le groupe « UV-B sur glace (RL) » a été réhydraté avec une période d'acclimatation à 90% d'humidité pendant 24 heures. ($n=3$).

2.3. Impact des UV-B sur la survie d'individus *A. vaga* desséchés

2.3.1. Impact de la température sur la survie suite à une irradiation aux UV-B

Les UVs sont des rayonnements ayant un impact létal sur les organismes et produisant une importante quantité de chaleur. C'est dans cette optique que nous avons étudié l'impact de la température induit par un rayonnement UV-B sur des individus d'*A. vaga* desséchés.

Des individus fraîchement desséchés ont été soumis à une irradiation de 15J.cm^{-2} d'un rayon monochromatique d'UV-B de longueur d'onde de 312 nm. Après l'exposition, les individus ont été réhydratés. Les individus contrôles ont été placés à 4°C et protégés des rayons pendant toute la durée de l'irradiation. Un groupe nommé « UV-B et température » a été exposé au rayonnement UV-B et n'a pas été protégé de la chaleur. Un groupe nommé « Température » a été protégé du rayonnement mais pas de la chaleur. Et le dernier groupe nommé « UV-B sur glace » a été exposé au rayonnement mais a été protégé de la chaleur par un support en glace refroidissant ainsi les échantillons. Toutes ces conditions ont été faites en trois répliques.

Les individus contrôles ont un taux de survie de $91,16 \pm 3,77\%$ après réhydratation (Fig. 31). Les individus du groupe « UV-B et température » ont une survie de $17,4 \pm 4,52\%$. La survie était supérieure dans le groupe « Température », atteignant $75,46 \pm 3,76\%$. Dans le groupe « UV-B sur glace » un taux de survie de $37,13 \pm 5,66\%$ a été observé, étant plus élevé que la combinaison UV-B et chaleur.

2.3.2. Impact des rayons UV-B

L'utilisation d'un support froid (c.à.d. de la glace) permet de maximiser la survie pendant une exposition aux UVs, limitant ainsi la létalité de l'irradiation aux actions directes des UVs. L'impact d'une dose d'énergie (en Joules) plus importante d'UV-B sur la survie d'*A. vaga* a été étudié sur des échantillons gardés sur glace. Des individus ont été exposés à une dose de 25J.cm^{-2} du même rayon monochromatique d'UV-B que lors de l'expérience précédente.

Les trois répliques du groupe « contrôle dessiccation » ont été réhydratés directement après dessiccation. Un second groupe contrôle, « Contrôle sur glace », a été placé sur glace pendant toute la durée d'exposition, étant protégés des UV-B. Les deux groupes tests d'*A. vaga* ont aussi été mis sur glace mais ont reçu la dose d'UV-B. Le groupe « UV-B sur glace (QR) » a été réhydraté de façon classique, quant au groupe « UV-B sur glace (LR) » il a été réhydraté après une acclimatation à 90 % d'humidité relative pendant 24h.

Les individus des groupes « contrôle dessiccation » et « contrôle sur glace » ont un taux de survie de $99,5 \pm 0,17\%$ et $99,3 \pm 2,26\%$ respectivement (Fig. 32). Les deux groupes exposés aux UV-B ont des taux de survie moyen de 0%, mais 3 individus vivants ont été observés dans un des répliques du groupe « UV-B sur glace (QR) ». Sur ces trois individus, deux ont donné une nouvelle population après 14 jours (observations personnelles)

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés exposés à -80°C

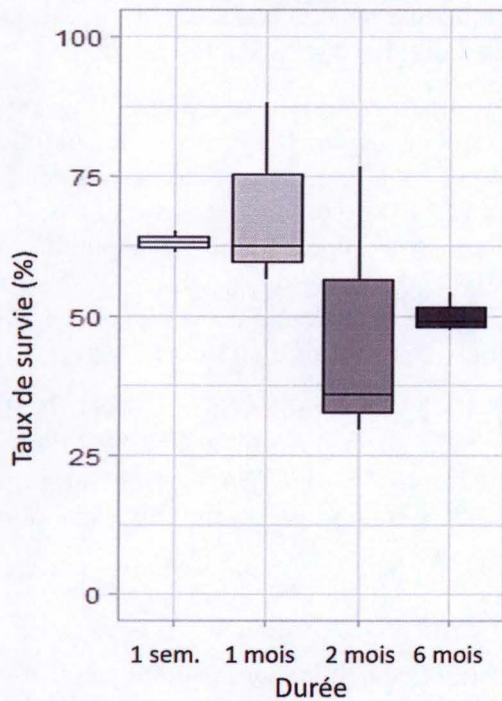


Figure 34 : Impact de la température -80°C sur la survie sur 10.000 individus *A. vaga*. Les individus ont été exposés pendant 1 semaine, 1, 2 et 6 mois à -80°C. (n = 3)

Taux de survie d'*A. vaga* desséchés exposés à -26°C

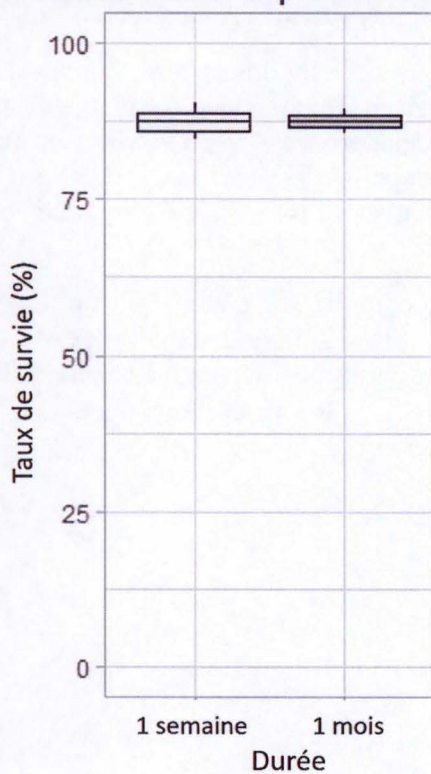


Figure 35 : Impact de la température -26°C sur la survie et sur 10.000 individus *A. vaga*. Les individus ont été exposés pendant 1 semaine et 1 mois à -26°C. (n = 2).

2.4. L'impact des températures basses sur la survie et la reproduction d'individus *A. vaga* hydratés

Les rotifères bdelloïdes sont connus pour avoir la capacité de survivre à de très faibles températures. Pour étudier cette capacité chez *A. vaga*, nous avons mesuré le taux de survie d'individu hydraté après une congélation à -26°C et -80°C dans 10mL d'eau, sachant que les individus desséchés survivent à -26°C et -80°C (Boris Hespeels, observation personnelle). L'impact de ces températures froides sur la fertilité a été évalué pour différentes durées de congélation. Les temps d'expositions ont été de 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 6 mois pour la température -80°C et de 1 semaine, 1 mois et 2 mois pour la température -26°C . Les expositions à -80°C ont été effectuées en trois réplicas et les expositions à -26°C en deux réplicas.

Après une congélation de 1 semaine à -80°C , on observe un taux de survie de $63,10 \pm 2,85\%$ (Fig. 33). Ce taux augmente pour les individus congelés à -80°C pendant 1 mois et diminue après 2 mois, respectivement atteignant $69,02 \pm 16,98\%$ et $47,5 \pm 25,45\%$. Dans ces deux conditions, une grande hétérogénéité dans les taux de survie a été observée entre les trois réplicas. La survie la plus basse observée après 1 mois était de $56,67\%$ et la survie la plus haute était $88,3\%$. L'écart entre la survie la plus faible et la survie la plus importante est plus importante encore après une exposition de 2 mois à -80°C , avec des taux de survie variant entre $29,7\%$ et $76,62\%$. Après une durée de 6 mois à -80°C , le taux de survie atteint 50% avec une moins grande variabilité (Fig 33).

A -26°C , le taux de survie atteint $87,49 \pm 4,22\%$ et $87,65 \pm 2,74\%$ après des temps d'expositions de 1 semaine et 1 mois respectivement (Fig. 34).

La capacité de reproduction des individus après décongélation a été étudiée pour les durées d'expositions de 1 semaine, 1 et 2 mois à -80°C et 1 semaine et 1 mois à -26°C . Après 1 semaine à -80°C les rotifères isolés ont une fertilité de $99,17\%$, qui diminue à $95,42\%$ et $96,67\%$ respectivement suite à des expositions de 1 et 2 mois à -80°C . Après une période d'une semaine à -26°C la fertilité est de $97,5\%$ et passe à $96,67\%$ après une exposition de 1 mois. La température basse a donc peu d'impact sur la fertilité des individus *A. vaga* qui survivent.

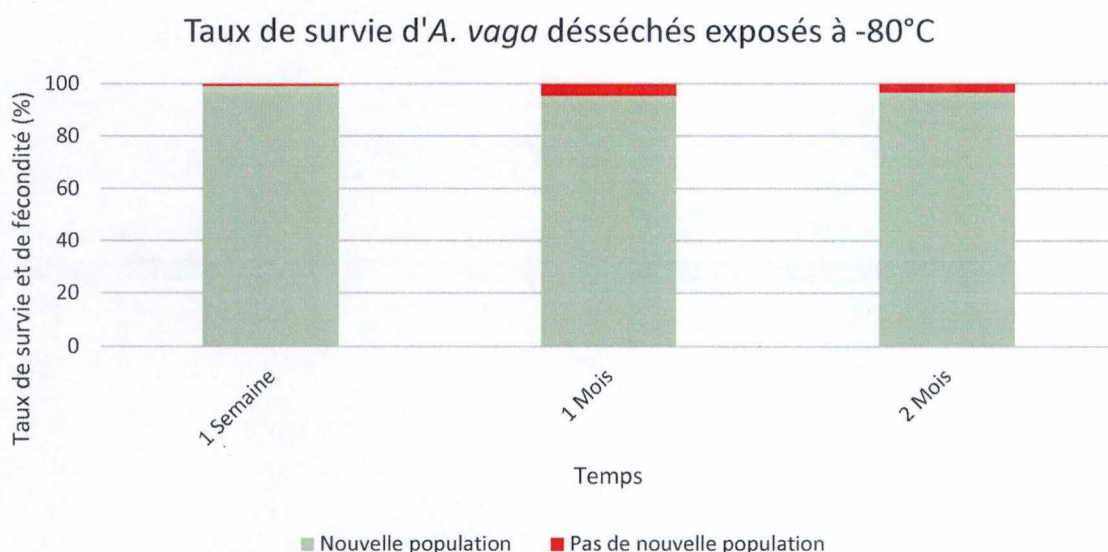


Figure 36 : Impact de la température -80°C sur la fertilité sur 10.000 individus *A. vaga*. Les individus ont été exposés pendant 1 semaine, 1 et 2 mois à -80°C. Leur capacité de reproduction a été estimée pour les périodes de 1 semaine, 1 et 2 mois en isolant de façon aléatoire 120 individus vivant. Les individus sont ensuite placés individuellement dans des plaques multi-puits. La reproduction a été évaluée par une observation directe de la présence de nouveaux individus sous microscope binoculaire. Les observations ont été effectuées 14 jours après l'isolation. Quand aucunes nouvelles populations n'a été observée, soit l'individu isolé est mort ou soit les œufs qu'il a pondus n'ont pas éclos.(n = 3).

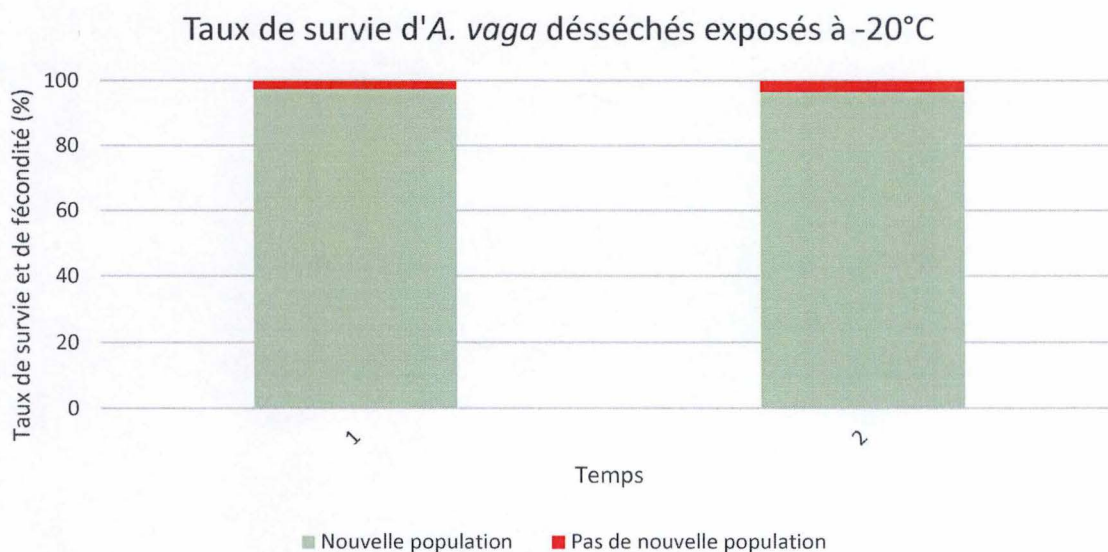


Figure 37 : Impact de la température -26°C sur la fertilité sur 10.000 individus *A. vaga*. Les individus ont été exposés pendant 1 semaine et 1 mois à -26°C. Leur capacité de reproduction a été estimée pour les périodes de 1 semaine et 1 mois en isolant de façon aléatoire 120 individus vivant. Les individus sont ensuite placés individuellement dans des plaques multi-puits. La reproduction a été évaluée par une observation directe de la présence de nouveaux individus sous microscope binoculaire. Les observations ont été effectuées 14 jours après l'isolation. Quand aucunes nouvelles populations n'a été observée, soit l'individu isolé est mort ou soit les œufs qu'il a pondus n'ont pas éclos.(n = 2).

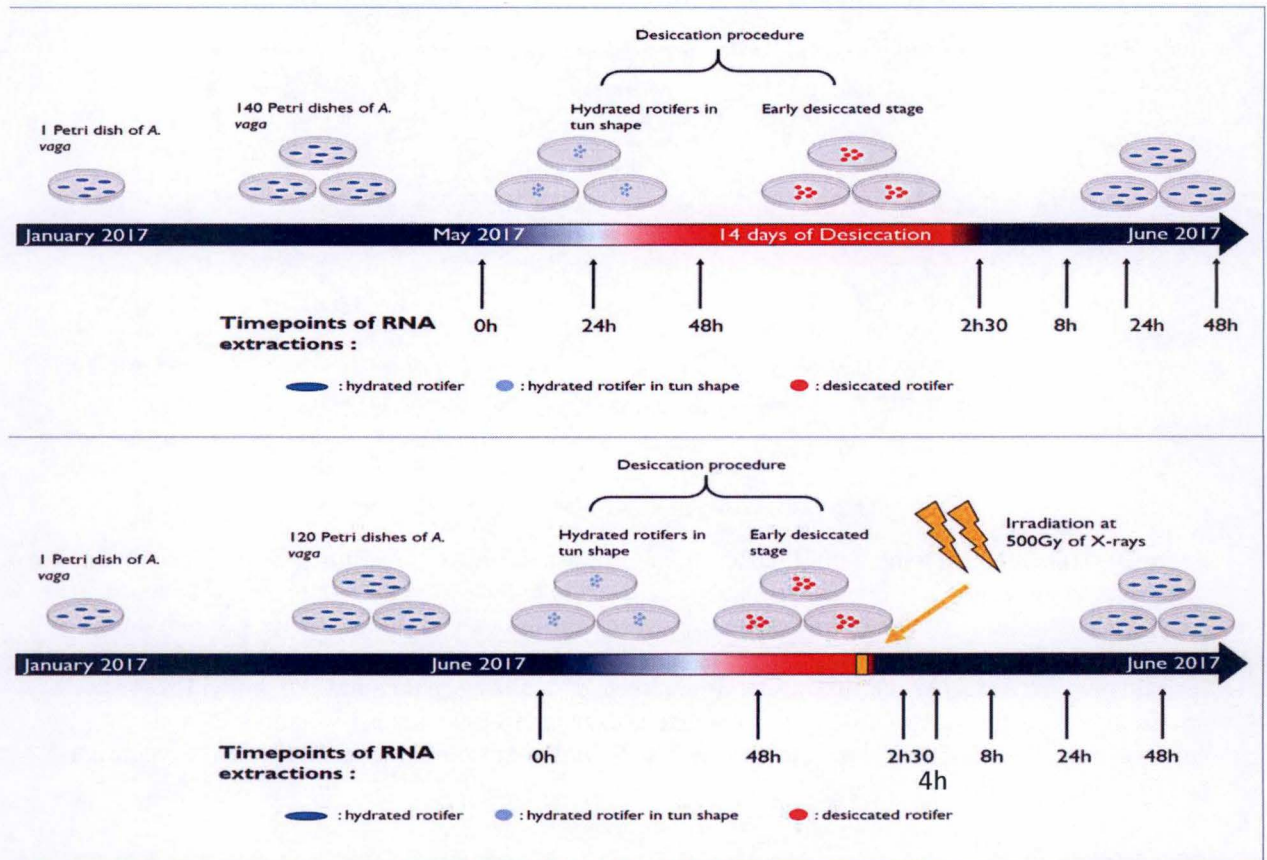


Figure 35 : Design expérimental pour l'étude de l'expression des ARNm des gènes codant pour des protéines des voies de réparations de l'ADN. Cette étude est effectuée après une période de dessiccation de 14 jours et sur des individus desséchés irradiés avec 500Gy de rayon X.

2.5. Les modifications d'expressions de gènes suite à la dessiccation et irradiation

2.5.1. Expression de gènes de réparation de l'ADN après une période de dessiccation

Les rotifères bdelloïdes savent réparer efficacement les DNA DSBs (Hespeels et al. 2014 ; mémoire Christophe Antoine). Dans le but d'observer l'expression des gènes spécifiquement impliqués dans la réparation des cassures double brins, en se focalisant particulièrement sur le mécanisme de réparation NHEJ, nous avons exposé en laboratoire des individus *A. vaga* à la dessiccation. Des individus ont été soumis à une période de 14 jours de dessiccation (experimental design Fig 35). Après 14 jours de dessiccation, des DSBs avaient été observés lors de précédentes études utilisant une PFGE. L'expression relative (*foldchange*) de certains gènes connus pour être des acteurs majeurs du NHEJ chez *A. vaga* a été étudiée avant et après la période de dessiccation. Lors de cette expérience, nous avons également cherché à caractériser l'expression des gènes ohnologues du NHEJ. Les gènes étudiés sont les acteurs clés : Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Ligase 4, ATM, XRCC4 et Pol λ . Au cours de l'expérience, des extractions d'ARN ont eu lieu à différents « *timepoints* ». Tout d'abord trois extractions (*timepoints*) d'ARN ont été effectuées avant la période de dessiccation : sur des individus hydratés, 24h (*timepoint* : HE) et 48h (*timepoint* : dessiccation) heures après le début du processus de dessiccation. Et quatre extractions ont eu lieu après les 14 jours de dessiccation : 2h30, 8, 24 et 48 heures après la réhydratation. Le gène de la protéine « Ubiquitin-60S ribosomal L40 » a servi de gène contrôle. Les résultats ont été normalisés et comparés en fonction des individus hydratés du laboratoire avant mise en dessiccation et réhydratation (Hespeels et al. 2015 ; Fig. 36 et 37). Cette expérience a été effectuée sur 4 réplicas. Cette étude est complémentaire à l'étude transcriptomique de Boris Hespeels (thèse 2016).

La protéine Ku80 est une protéine qui intervient au début de la voie NHEJ, elle est en dimère avec la protéine Ku70 et se fixe autour des doubles brins d'ADN cassés. L'amorce Ku80-A2 utilisée permet d'observer l'expression des ARNm de deux allèles homologues codant pour cette protéine. Nous observons une augmentation significative du niveau d'expression des ARNm pendant tous les *timepoints* de la dessiccation par rapport au contrôle, puis de nouveau une augmentation significative durant toute la période de réhydratation. L'expression relative des 2 copies de ce gène est multipliée par 3,3 au *timepoint* 48 heures réhydratation. Un schéma d'expression relative semblable est trouvé pour les gènes Pol λ (amorce : PollA2) et DNA-PKcs (amorce : PKCs-A2). La protéine DNA-PKcs intervient au début de la voie de réparation pour faire un pont entre les extrémités des DNA DSBs. Et la protéine Pol λ intervient plus tard dans le mécanisme de réparation pour compléter les mono brins et ainsi obtenir des doubles brins. Leurs profils d'expressions relatives montrent une augmentation significative de l'expression relative de ces gènes à tous les « *timepoints* » de l'expérience par rapport au contrôle. Une augmentation du niveau d'expression de 4,4 fois a été observée pour les copies du gène DNA-PKcs au *timepoint* 8 heures réhydratation et une augmentation de 2,8 fois au *timepoint* 8 heures réhydratation pour les copies du gène Pol λ .

Une augmentation significative de l'expression relative à tous les « *timepoints* » est visible pour les copies homologues des gènes de Ku70 (amorce : Ku70-A1) et de Ku80 (amorce : Ku80-B2). Un *foldchange* de 2,9 fois a été observé pour les copies du gène Ku70 au *timepoint* 48 heures réhydratations par rapport au contrôle, et un *foldchange* de 2,6 fois pour le *timepoint* 8 heures réhydratation pour les copies du gène Ku80-B2.

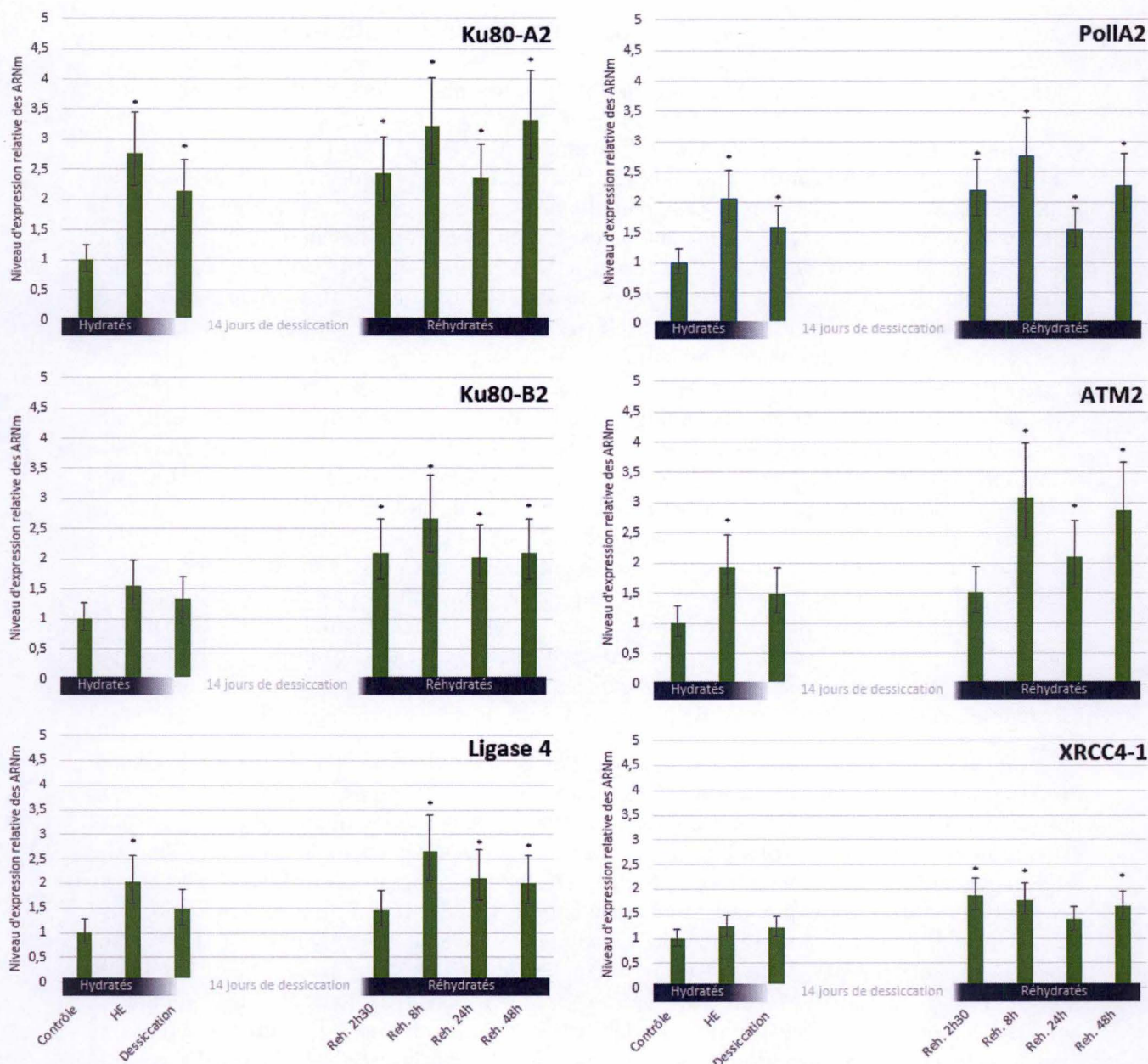


Figure 36 : Expression relative des gènes de Ku80, Ligase 4, XRCC4, ATM et la polymérase λ dans des individus d'*A. vago* soumis à une dessiccation de 14 jours et à une réhydratation. Les amorces sont spécifiques à un couple d'allèle homologue. Ku80-A2 et Ku80-B2 se fixent sur des ohnologues. Les sept *timepoints* analysés sont : (1) contrôle/hydraté ; (2) humidity effect/24h dessiccation ; (3) desséchés un jour/48h dessiccation ; (4) 2h30 réhydratation après 14 jours de dessiccation ; (5) 8 heures réhydratation après 14 jours de dessiccation ; (6) 24 heures réhydratation après 14 jours de dessiccation ; (7) 48 heures réhydratation après 14 jours de dessiccation. Le niveau d'expression a été normalisé par un gène de référence le gène L40. Le niveau d'expression relative a été calculé en fonction de l'instant contrôle (valeur = 1). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% (méthode de Holm-Sidak, *P<0,05).

Les copies des gènes d'ATM (amorce : ATM2) et de la Ligase 4 (amorce : Ligase 4) ont des profils d'expression relatives similaires. La protéine ATM intervient en début de réparation pour permettre la création d'un site de fixation. La protéine ligase 4 est quant à elle une protéine. L'expression relative de ces copies durant les instants 8, 24 et 48 heures de réhydratations avec une augmentation maximale de 3,1 fois pour les copies du gène ATM et de 2,7 fois pour les copies de la ligase 4. Une augmentation significative est aussi visible lors du *timepoint* HE pour les copies du gène de la ligase 4 (*fold change* = 2) et pour les copies du gène ATM (*foldchange* = 1,9).

Finalement, les copies des gènes de Ku70 (amorce : Ku70-B2) et des gènes XRCC4 (amorce : XRCC4-1) apparaissent avec une augmentation significative de leur niveau d'expression relative au cours de la réhydratation 2h30, 8 et 48 heures. Un *foldchange* de 2,7 pour les copies du gène Ku70 au *timepoint* 48 heures réhydratation et un *foldchange* de 1,9 pour les copies du gène XRCC4 au *timepoint* 2h30 réhydratation a été observé. Dans le cas de XRCC4, le niveau d'expression relative lors du processus de dessiccation ne montre pas de différence significative par rapport au contrôle. Une augmentation significative apparaît au *timepoint* HE pour les copies du gènes Ku70 pendant le processus de dessiccation (*foldchange* = 2,2).

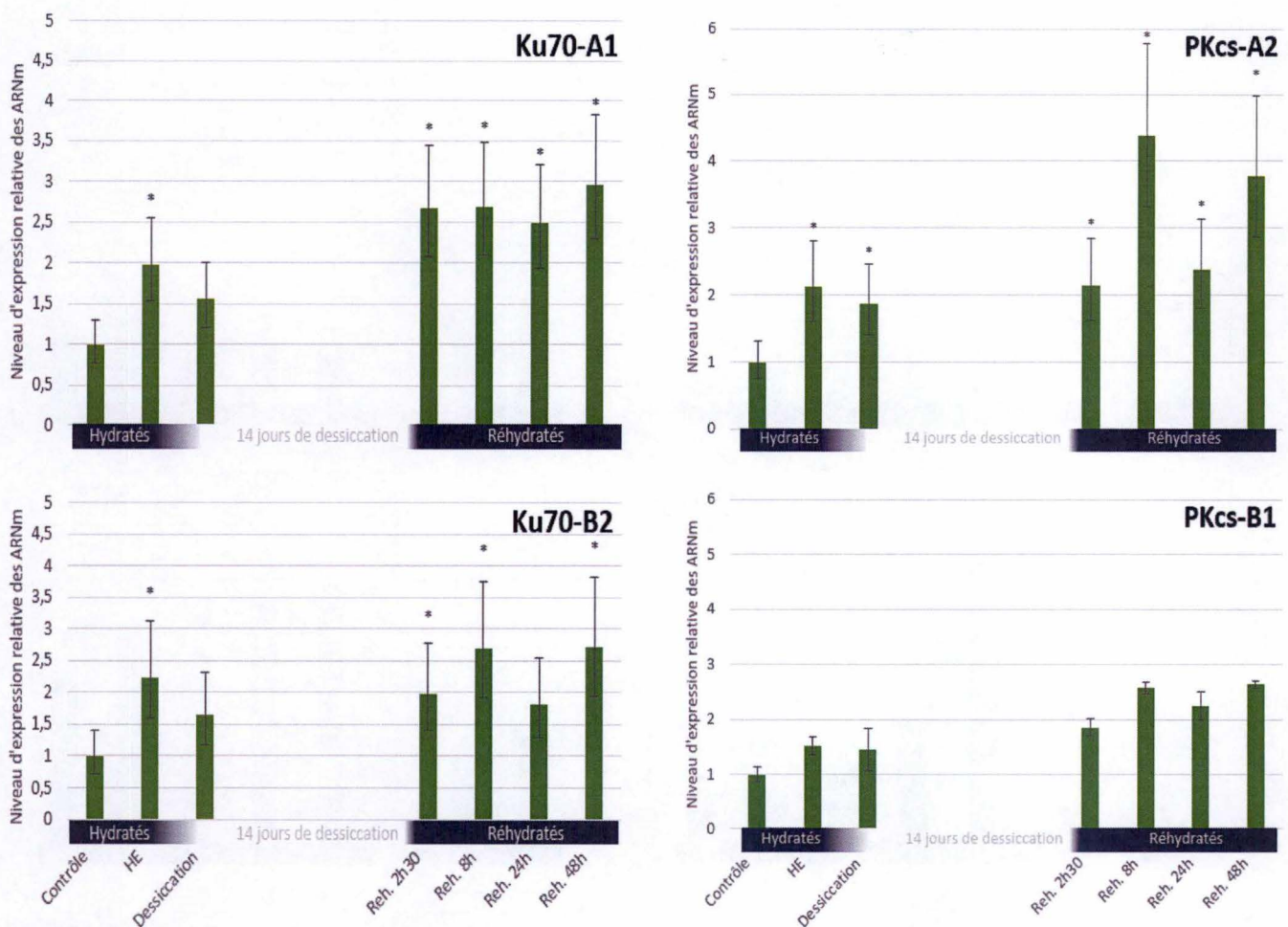


Figure 37 : Expression relative des gènes de Ku70 et PKCs dans des individus d'*A. vaga* soumis à une dessiccation de 14 jours et à une réhydratation. Les amorces sont spécifiques à un couple d'allèle homologue. Ku70-A1 et Ku70-B2 comme PKCs-A2 et PKCs-B1 se fixent sur des paires des ohnologues. Les sept *timepoints* analysés sont : (1) contrôle/hydraté ; (2) humidity effect/24h dessiccation ; (3) desséchés un jour/48h dessiccation ; (4) 2h30 réhydratation après 14 jours de dessiccation ; (5) 8 heures réhydratation après 14 jours de dessiccation ; (6) 24 heures réhydratation après 14 jours de dessiccation ; (7) 48 heures réhydratation après 14 jours de dessiccation. Le niveau d'expression a été normalisé par un gène de référence le gène L40. Le niveau d'expression relative a été calculé en fonction de l'instant contrôle (valeur = 1). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% (méthode de Holm-Sidak, * $P < 0,05$).

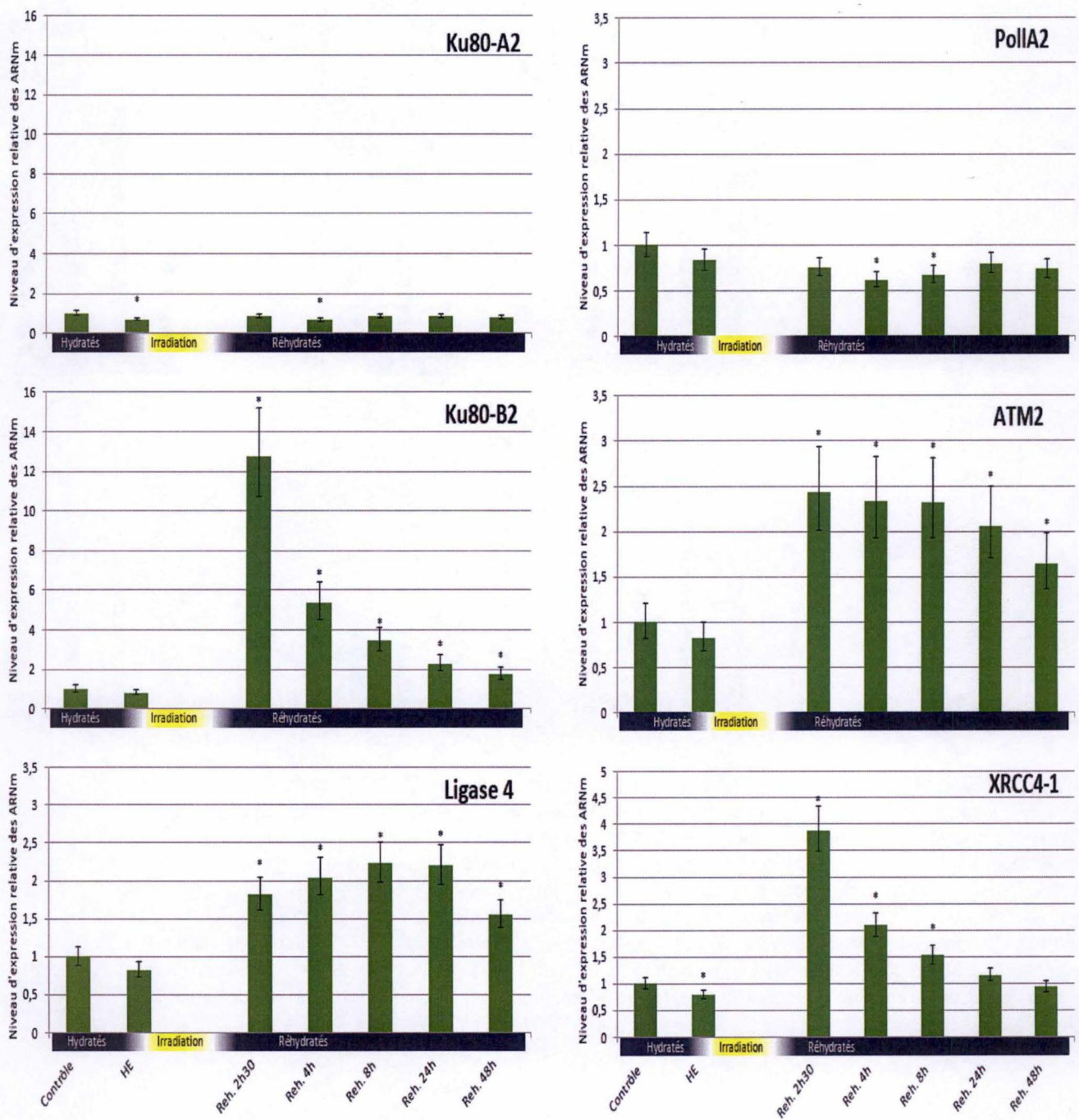


Figure 38 : Expression relative des gènes de Ku80, Ku70, Ligase 4, XRCC4, ATM et la polymérase λ dans des individus desséchés 1 jour d'*A. vaga* et soumis à l'irradiation de 500Gy de rayons X. Les amorces sont spécifiques à un couple d'allèle homologue. Ku80-A2 et Ku80-B2 se fixent sur des paires d'allèles homologues différentes. Les sept *timepoints* analysés sont : (1) contrôle/hydraté ; (2) desséchés un jour/48h dessiccation ; (3) 2h30 réhydratation après une irradiation de 500Gy ; (4) 4 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy (5) 8 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy ; (6) 24 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy ; (7) 48 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy. Le niveau d'expression a été normalisé par un gène de référence le gène L40. Le niveau d'expression relative a été calculé en fonction de l'instant contrôle (valeur = 1). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% (méthode de Holm-Sidak, *P<0,05).

2.5.2. Expression de gènes de réparation de l'ADN après irradiation au rayon X

Un nombre plus important de DNA DSBs pourrait engendrer une augmentation de la réponse cellulaire, et donc une augmentation du niveau d'expression relative des gènes des voies de réparation de l'ADN. Une deuxième expérience a donc été effectuée pour induire un plus grand nombre de DNA DSBs, au moyen d'irradiation rayons X. Des individus *A. vava* desséchés un jour ont été irradiés à une dose de 500Gy de rayon X (Fig. 35B). Les gènes étudiés sont les mêmes que dans l'expérience précédente. Le nombre de *timepoints* étudiés est différent, il y en a deux avant l'irradiation : individus hydratés (le contrôle) et 48 heures après le début de la dessiccation. Après l'irradiation il y a 5 *timepoints* : 2h30, 4, 8, 24 et 48 heures après réhydratation. Le gène de la protéine « Ubiquitin-60S ribosomal L40 » a servi de gène contrôle pour l'analyse des résultats et les résultats ont été normalisés en fonction des individus hydratés (Fig. 38 et 39). Cette expérience a été effectuée sur 4 réplicas.

Plusieurs résultats similaires d'expressions relatives au cours des différents *timepoints* sont observés. Pour les copies des gènes Ku80 (amorce : Ku80-B2), PKCs (amorce : PKCs-B1), ATM (amorce : ATM2) et la ligase 4 (amorce : Ligase 4) on observe une augmentation significative de leur niveau d'expression relative à tous les *timepoints* de la réhydratation par rapport au contrôle. Le niveau d'expression relative des copies du gènes Ku80-B2 est 12 fois plus important que le contrôle au *timepoint* 2h30 après réhydratation, et 8 fois pour les copies du gène PKCs. Lors du processus de dessiccation, aucune modification significative n'est observée dans leur niveau d'expression relative.

Des augmentations significatives de l'expression relative sont observées chez les copies du gène XRCC4 (amorce : XRCC4-1) pendant les 3 premiers *timepoints* de la réhydratation. Le *timepoint* 2h30 réhydratation a un *foldchange* de 3,9, ce dernier diminue lors des *timepoints* suivant. Pendant le processus de dessiccation une diminution significative (*foldchange* = 0,8) est visible à l'instant 48 heures après le début du processus de dessiccation. Les copies du gène Ku70 ont un profil d'expression relative quasiment similaire, on observe une augmentation significative du *foldchange* durant les 4 premiers *timepoints* de la réhydratation avec un *foldchange* de 9,4 pour le *timepoint* 2h30 réhydratation. Mais les copies du gène Ku70 ne montrent pas de différences significatives d'expression relative par rapport au contrôle pendant le processus de dessiccation.

Les copies des gènes Ku80 (amorce : Ku80-A2) et PKCs (amorce : PKCs-A2) ont des profils d'expression relative de réhydratations faibles. Dans le cas de Ku80, une diminution significative (*foldchange* = 0,7) par rapport au contrôle au *timepoint* 4 h réhydratation a été observé. Une diminution de l'expression relative des copies de ce gène a aussi été observé 48 heures après le début du processus de dessiccation (*foldchange* = 0,7). Les copies du gène PKCs montrent une diminution significative (*foldchange* = 0,6) au *timepoint* 4 heures réhydratation. Aucune autres différences significatives n'ont été observés aux autres *timepoints*.

Finalement, les copies des gènes Pol λ (amorce : PollA2) et Ku70 (amorce : Ku70-B2) apparaissent avec une diminution significative de leur niveau d'expression relative aux *timepoints* réhydratation 4 et 8 h. Dans le cas du gène Pol λ , il y a une diminution de 0,6 fois au *timepoint* 4 heures réhydratation et de 0,7 fois au *timepoint* 8 heures réhydratation. De plus son niveau d'expression relative lors du processus de dessiccation ne montre pas de différence significative par rapport au contrôle. Pour les copies du gène de Ku70, il y a une diminution de 0,6 fois aux *timepoints* 4 et 8 h réhydratation. En plus on observe une diminution significative (*foldchange* = 0,5) de l'expression relative 48 heures après le début du processus de dessiccation.

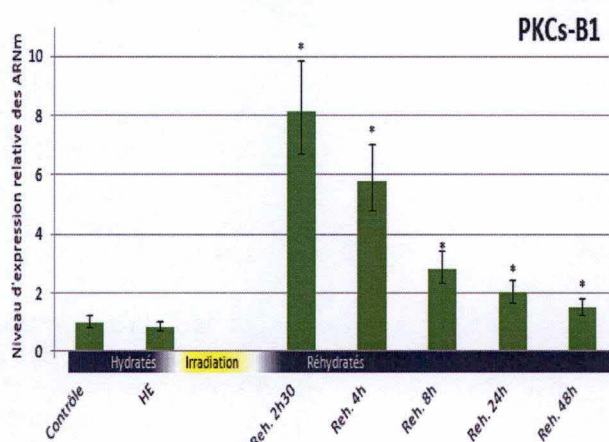
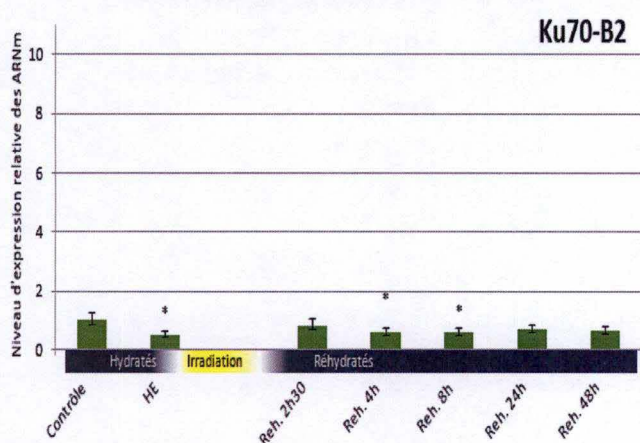
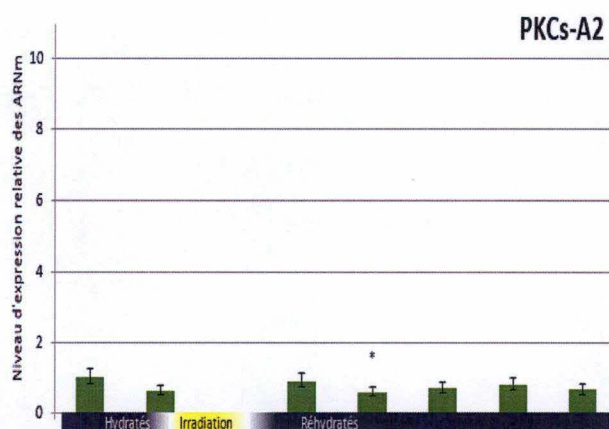
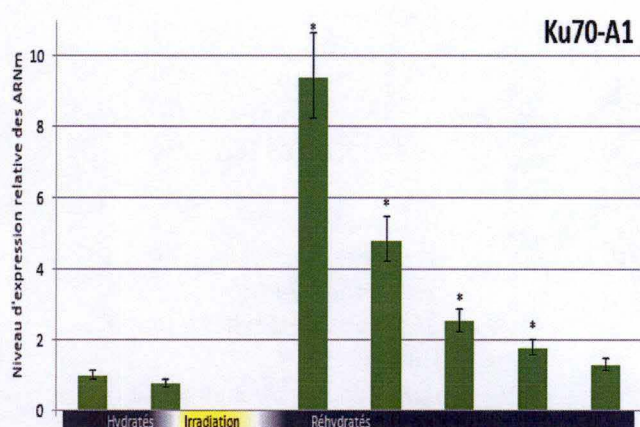


Figure 39 : Figure 38 : Figure 36 : Expression relative des gènes de Ku80, Ku70, Ligase 4, XRCC4, ATM et la polymérase λ dans des individus desséchés d'*A. vaga* soumis irradiation de 500Gy de rayons X. Les amorces sont spécifiques à un couple d'allèle homologue. Ku70-A1 et Ku70-B2 comme PKCs-A2 et PKCs-B1 se fixent sur des paires d'allèles homologues différentes. Les sept *timepoints* analysés sont : (1) contrôle/hydraté ; (2) desséchés un jour/48h dessiccation ; (3) 2h30 réhydratation après une irradiation de 500Gy ; (4) 4 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy (5) 8 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy ; (6) 24 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy ; (7) 48 heures réhydratation après une irradiation de 500Gy. Le niveau d'expression a été normalisé par un gène de référence le gène L40. Le niveau d'expression relative a été calculé en fonction de l'instant contrôle (valeur = 1). Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% (méthode de Holm-Sidak, *P<0,05).

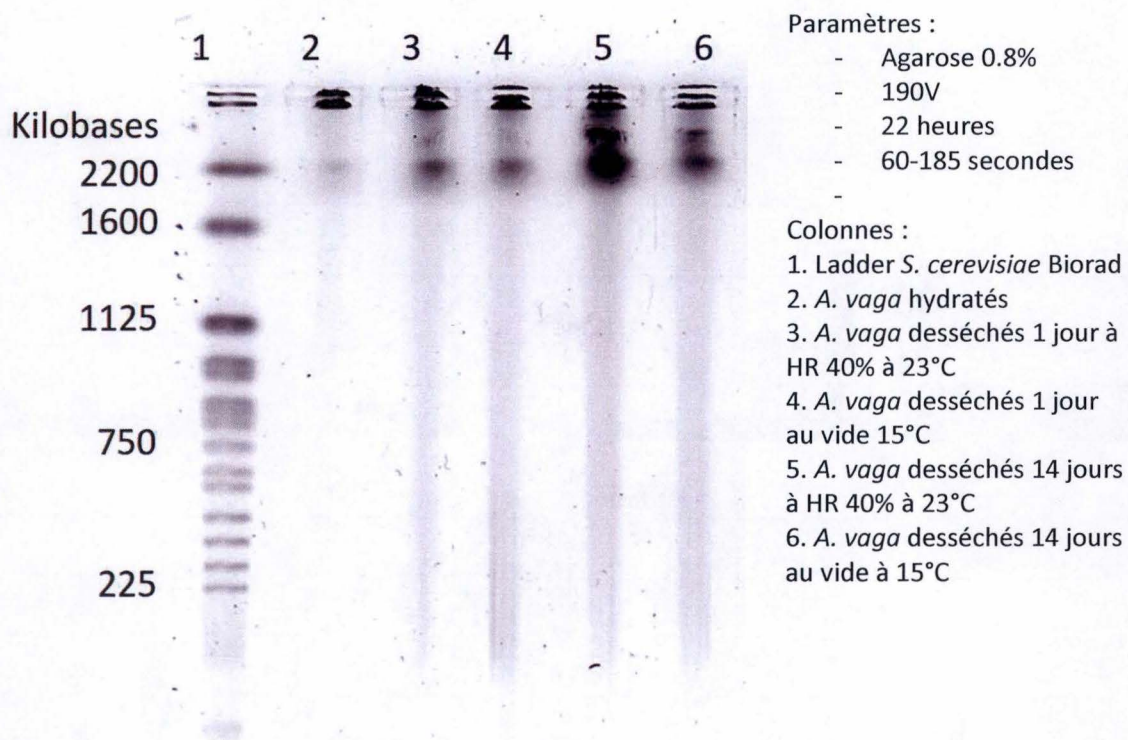


Figure 40 : Analyse par Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) de l'effet du vide sur l'intégrité du génome d'*A. vanga* fraîchement desséchés. Des individus desséchés ont été exposés 1 et 14 jours à la dessiccation ou au vide. La première colonne (1) représente le caryotype de *Saccharomyces cerevisiae*. Le deuxième colonne était composée d'*A. vanga* hydratés comme contrôle.

26 Impact du vide sur l'intégrité du génome d'*A. vaga*

Les dommages à l'ADN ont été décrits comme dommages induits par une exposition au vide chez les bactéries (Nicholson et al. 2000). Nous avons exposé des individus desséchés à des périodes de 1 et 14 jours au vide et aux mêmes périodes en dessiccation afin de voir si le vide induisait des DNA DSBs sur le génome d'*A. vaga*. La présence DNA DSBs au sein du génome d'individus d'*A. vaga* desséchés a été évaluée par PFGE suivant le protocole d'Hespeels et al. (2014). Chaque échantillon contenait environ 1.000 individus.

Des échantillons desséchés exposés à des périodes de 1 et 14 jours au vide ou à la dessiccation ont été analysés (Figure 40). Les individus contrôles (hydratés ; colonne 2) ne présentent pas de DNA DSBs au sein du gel de migration. Après un jour de dessiccation (colonne 3) des DNA DSBs sont visibles par la présence d'un smear allant de 2.200 à 225 kb. De gros fragments sont également visibles aux alentours de 2.200 kb. Après un jour de vide (colonne 4), des DNA DSBs sont aussi visibles, il apparaît un profil de migration similaire au 1 jour dessiccation. Après une période de 14 jours en dessiccation (colonne 5), un smear entre 2.200 et 225 kb est visible, son intensité est plus importante qu'après 1 jour. Il y a la présence d'un fort signal vers 2.200 kb. Dans la condition après 14 jours de vide (colonne 6), il y a une intensité du smear plus faible qu'après les 14 jours de dessiccation. L'intensité du signal à 2.200 kb est aussi plus faible que pour la condition 14 jours de dessiccation.

3	<i>Discussions et perspectives</i>	36
31	L'impact de la température	36
32	L'impact de la lyophilisation et du vide	37
33	L'impact des UV-B	39
34	L'expression de gènes de réparation lors d'une dessiccation et d'une irradiation	40
341	Transcriptome	41
35	L'intégrité du génome après une exposition au vide	41
36	Un modèle potentiel pour la recherche spatiale	42

3 Discussions et perspectives

Toutes les expériences et données récoltées durant mon mémoire ont été faites dans le cadre du projet RISE (Rotifer in Space). Ce projet a pour but d'envoyer des individus d'*Adineta vaga* dans l'espace et au sein de la station spatiale internationale. En ce sens, toutes les données collectées sont essentielles pour fournir un cadre pour les expériences spatiales. Les expériences effectuées sur terre permettent d'avoir des résultats préliminaires sur la tolérance à des conditions spatiales spécifiques telles les différentes sources de radiations, le vide, etc. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes tout particulièrement intéressé au vide, à des températures extrêmes et à d'importantes doses d'UV-B. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de réparation des DNA DSBs et plus particulièrement à la voie NHEJ. Pour cela nous avons sélectionné des gènes connus pour être des facteurs majeurs de cette voie et testé leur niveau d'expression par RT-qPCR en fonction des différents états : hydraté ; desséché (avec ou sans irradiation); réhydraté.

31 L'impact de la température

La résistance des rotifères bdelloïdes aux fortes températures a été décrite principalement chez les individus à l'état desséché (Rahm 1924, Caprioli & Ricci 2002). Néanmoins ces études montrent une résistance plus importante chez les individus desséchés que chez les individus hydratés. Dans les cas de la résistance aux températures extrêmes des rotifères bdelloïdes *Adineta vaga*, peu de données sont disponibles. Or, dans le cadre d'un voyage spatial, les échantillons peuvent être soumis à d'importantes modifications de températures (science.nasa.gov). Une des questions de ce mémoire était de savoir si la température a un effet sur la survie et la fertilité des rotifères bdelloïdes *A. vaga*, et si cet impact est lié à l'induction de dommages à l'ADN ou aux protéines au sein des individus. Ces dommages ont-ils un impact sur la fertilité des individus.

Au cours de mon mémoire, Nous avons observé que la résistance maximale d'*A. vaga* à l'état desséché aux hautes températures était de 75°C pendant une durée de 2 heures (une exposition de plus longue durée induit la mort de tous les individus). Une exposition à 100°C pendant 5 minutes a été testée au cours de mon mémoire induit une mortalité de 100%. Cependant il est à noter que dans cette expérience de traitement à 100°C, l'augmentation de la température subit par les échantillons a été de 108°C.min⁻¹.

Cette augmentation rapide a déjà été observée comme ayant un impact négatif plus important qu'une augmentation lente de la température (Mertens et al. 2008). Des individus de l'espèce *Philodina roseola* desséchés ont une survie de 19,80% avec une augmentation lente de la température à 110°C et une survie de 1,86% avec une augmentation rapide de la température.

C'est pourquoi, certaines températures ont de nouveau été testées mais avec une augmentation lente de la température. Néanmoins, même avec une montée lente et graduelle de la température de 1°C.min⁻¹, la température de 99°C est létale pour *A. vaga*. La résistance à la température d'*A. vaga* est donc inférieure à la résistance trouvée chez les rotifères bdelloïdes *Philodina roseola* comme décrit précédemment (Mertens et al. 2008). Il serait intéressant de poursuivre ces expériences avec des individus hydratés et ces résultats devraient être comparés à des espèces plus sensibles ou plus tolérantes.

Une étude de la cinétique de survie d'*A. vaga* a été effectuée à une température de 65°C. Cette température a été choisie du fait que les individus *A. vaga* desséchés résistent à une exposition de 66 heures à cette température et qu'il était possible de voir des individus actifs dans les 48

heures qui suivaient la réhydratation. Cette expérience a montré que le taux de survie d'*A. vaga* desséché diminue en fonction du temps d'exposition (de 45,51% après 2 heures à 0.08% après 48 heures).

La diminution de la survie observée à de grandes températures pourrait être expliquée par la dénaturation des protéines, qui deviennent irréversibles à des températures

supérieures à 80°C (Peppenberger et al. 1997). D'un autre côté, les protéines comme les LEA interviennent dans la stabilité des protéines (Hand et al. 2011), elles pourraient intervenir avec les HSPs dans la tolérance à des températures extrêmes. Afin de tester cela, il serait possible de regarder l'expression relative des copies des gènes de LEA et des HSPs après différentes périodes à une température de 65°C.

Dans l'espace il est possible de rencontrer des modifications de températures parfois brutales (ex. départ d'une navette ou éruption solaire). Ces expériences sur les températures extrêmes, pour des êtres vivants, ont montré qu'*A. vaga* était tolérant à de forte température pour des courtes et moyennes durées, tel 75°C pendant 2 heures. Et qu'ainsi les échantillons présents en dehors de l'ISS pourraient survivre à une modification et à une augmentation importante de la température.

Notre étude a aussi examiné l'impact de températures négatives sur la survie et la capacité de reproduction d'*A. vaga* desséchés et hydratés. Les résultats obtenus dans le cas des températures de -26°C (1 mois) et de -80°C (6 mois), sur des individus hydratés, montrent un taux de survie supérieur à 50% et un taux de reproduction supérieur à 95%. *A. vaga* hydratés montre un taux de survie plus faible à -80°C que les bdelloïdes *M. quadrifornifera* (88,6% après 5 jours contre 63,10% après 1 semaine pour *A. vaga*) étudiés par (Caprioli & Ricci 2002). Le taux de survie d'*A. vaga* diminue à 50% après une exposition de 6 mois. Une grande hétérogénéité entre les réplicas est observée pour les durées de 1 et 2 mois. La survie des réplicas varie de 76,62% à 29,7% après 2 mois à -80°C. Un des paramètres pouvant impacter cette survie et être la cause de la variabilité observée pourrait être la température de décongélation, ainsi il est important de réitérer cette expérience avec une décongélation des échantillons à une température précise et non à température ambiante.

La tolérance à une congélation de -26°C est quant à elle plus importante qu'à -80°C avec une survie de 87,65% après une congélation d'un mois (contre 69,02% après 1 mois à -80°C). Il est cependant intéressant d'observer que ces animaux sont résistants à la congélation, même à -80°C et pendant de longue durée (survie de 50% après 6 mois), ce qui est important sur les voyages spatiaux afin de préserver les animaux une fois les expériences faites. Les animaux adaptés pour survivre à l'anhydrobiose survivent souvent à la cryptobiose, car dans les deux cas l'eau est absente. C'est probablement la raison pour laquelle *A. vaga* peut tolérer le gel.

Aussi en terme d'étude des mécanismes de résistance aux températures extrêmes mais aussi pour des raisons pratiques de vol spatial pour lesquels les rotifères pourraient vont être amenés à être soit à l'état desséché soit hydraté, il serait intéressant de compléter cette étude avec des individus d'*A. vaga* desséchés.

32 L'impact de la lyophilisation et du vide

Les individus anhydrobiotiques ont le potentiel pour résister au vide spatial (Jönsson et al. 2008). La résistance au vide a déjà été testée sur d'autres organismes tel les tardigrades, qui sont un modèle dans la recherche spatiale (Erdmann & Kaczmarek 2016). Les tardigrades survivent à une exposition de 10 jours au vide à l'état desséché sans différence significative par rapport aux individus contrôles (Jönsson et al. 2008). Les expériences faites lors de mon

mémoire ont pour but de documenter la survie d'*A. vaga* exposé au vide et d'étudier l'impact de la durée d'exposition sur la survie.

Le taux de survie des individus desséchés après une exposition de 1 jour au vide diminue de 35% par rapport aux individus contrôles, mais est toujours supérieur à 50% suggérant qu'*A. vaga* desséchés peut résister au vide. Une longue exposition au vide (supérieur à 6 jours) induit une diminution du taux de survie d'*A. vaga* aux alentours de 20% et est maintenue même après une exposition de 2 mois. Il est à noter que ce test a été effectué avec des groupes d'individus de départ issus d'expériences indépendantes (dessiccations), aussi il est nécessaire de réitérer cette expérience avec un même pool d'individus de départ pour pouvoir comparer les résultats. L'utilisation de pool de départ différent induit un pourcentage d'erreur dans la survie des individus contrôles (fraichement desséchés) car ces derniers varient d'une dessiccation à l'autre. Si ce résultat subsiste cela poserait la question de l'observation d'une décroissance importante de la survie dans les 6 premiers jours d'exposition suivi d'un maintien à 20% de survie après ces 6 jours. Actuellement ce résultat n'a été décrit sur aucun autres organismes. Il serait aussi intéressant de connaître la cinétique de la survie au vide pour des expositions de quelques minutes à 6 jours afin de voir comment la survie diminue, si cette diminution est linéaire ou brutale.

L'eau résiduelle présente dans les rotifères desséchés mis sous vide est susceptible de se vaporiser lors de l'exposition au vide. Ce phénomène pourrait entraîner des dommages au niveau cellulaire. A des faibles pressions (< 6 mbar) l'eau liquide se met à bouillir à des températures proches de 0°C (iapws.org). Aussi nous avons testé l'impact de la lyophilisation après la dessiccation dans le but d'enlever le plus d'eau possible des rotifères desséchés en évitant l'état liquide de l'eau : l'eau passant directement de l'état solide à l'état gazeux. Ce processus n'a pas amélioré la survie, au contraire il a été observé que le processus seul induisait une diminution de la survie à 59,58% par rapport au contrôle où la survie est de 93,23%. La combinaison de la lyophilisation et de la période de vide diminue de façon importante la survie à 34,84%. Cette diminution de la survie pourrait avoir comme origine de multiplier les périodes de vide car le processus de lyophilisation comprend une période de vide. De plus la dépressurisation rapide pourrait avoir un impact sur la survie des échantillons.

L'hypothèse de multiplication des périodes de vide a été testée au moyen d'une exposition comprenant 5 cycles de modification de la pression. Aucune différence n'a été observée entre cette exposition et l'exposition contrôle qui consistait à une période de même durée mais à une exposition au vide continue. L'action de la modification de la pression ne peut donc pas être la seule responsable de cette importante diminution de la survie. Les périodes de vide sont connues pour induire des dommages à l'ADN chez les bactéries tel que des DNA DSBs (Nicholson et al. 2000), nos données relatives à l'intégrité du génome d'*A. vaga* après une période de vide nous montrent qu'il n'y a pas une augmentation des DNA DSBs dans le vide.

Une modification du protocole de réhydratation a été testée dans le but d'améliorer la survie. Il avait été montré au sein du laboratoire que la survie des œufs après une période de dessiccation était plus importante en effectuant une pré-réhydratation (Matthieu Terwagne, communication personnelle). Une expérience préliminaire a donc été réalisée afin de savoir à quelle humidité relative et pendant combien de temps la survie augmente le plus après une période de vide. Des individus ont été exposés 6 jours au vide et à une humidité relative de 90% : ce qui permet d'obtenir une meilleure survie à 75,8%. C'est donc ce pourcentage d'humidité relative qui a été

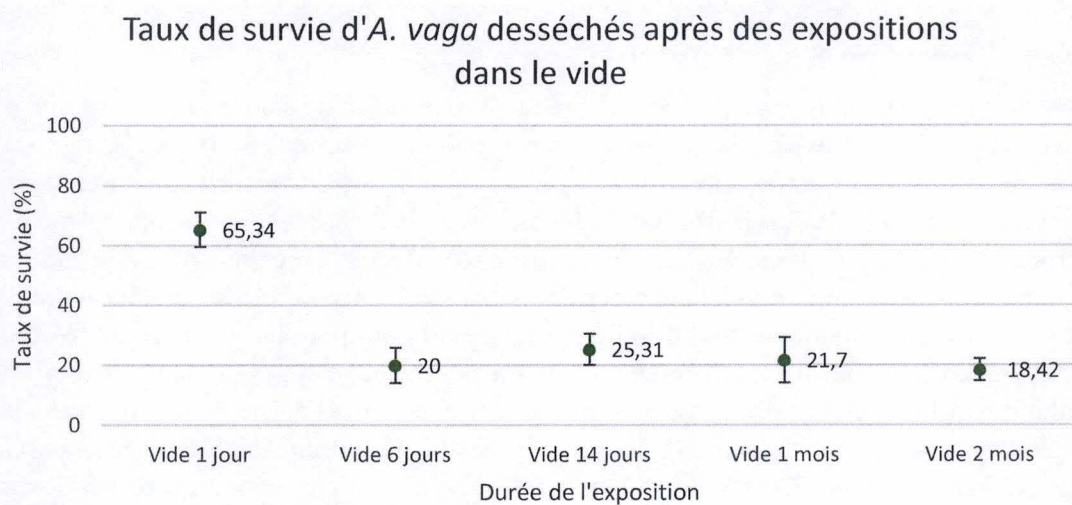


Figure 41 : Impact du temps passé dans le vide sur la survie d'individus d'*A. vaga* desséchés. La survie des individus desséchés après des expositions de 1, 6, 14, 30 et 60 jours dans le vide. Les résultats proviennent de plusieurs expériences. (n = 3) choisi afin d'observer l'effet de cette « pré-réhydratation » sur la survie après des expositions plus longues.

Cette expérience a montré qu'une période de pré-réhydratation trop longue a un effet négatif sur la survie (19,5% contre 28,4% chez les individus réhydratés sans pré-réhydratation). A l'inverse des périodes de 6 ou 24 heures permettent d'augmenter la survie. Mais cette augmentation diminue plus la période de vide est importante (une survie de 61,1% après 14 jours à une survie de 29,97 après 2 mois de vide). L'augmentation de la survie après une pré-réhydratation pourrait être due à une nécessité des individus de réveiller leur métabolisme de façon lente afin de réparer les dommages les plus importants avant d'être pleinement actifs.

Ce résultat met en lumière que malgré un apparent maintien de la survie à 20% après une exposition de 6 jours (Fig. 41), le temps a un effet sur la survie. Certains dommages induits lors de cette période de vide semblent nécessiter un réveil lent pour être réparés. Cependant même sans la pré-réhydratation, *A. vaga* est capable de survivre 2 mois dans le vide avec une survie de 18,42%. Ces données permettent de supposer qu'*A. vaga* a les capacités de survivre à des expositions de plus longues durées au vide. Une étude de la survie sur des temps d'exposition plus long permettraient de compléter cette tolérance au vide.

33 L'impact des UV-B

Les UV sont connus pour induire une augmentation de la température et pour avoir un impact négatif sur le taux de survie d'individus desséchés et hydratés d'*A. vaga* (Hespeels et al. 2014). La température, comme discuté précédemment, a un impact important sur la survie des rotifères desséchés. Dans cette étude nous séparons l'impact des radiations et de la chaleur, en limitant l'augmentation de la chaleur des échantillons durant une irradiation aux UV-B en mettant l'échantillon sur glace et en bloquant les radiations sur d'autres échantillons.

Notre expérience a montré que la chaleur induite par les UV-B (lors d'une irradiation à une dose de 15J.cm^{-2}) avait un impact négatif sur la survie des individus desséchés avec une baisse de la survie de 15% par rapport aux individus contrôles. Les radiations UV-B seules ont aussi un important effet sur la survie des individus desséchés gardés sur glace, cette survie diminue de 50% par rapport aux contrôles. L'effet négatif est plus important lors d'une irradiation sans protection contre la chaleur, une chute brutale de 70% par rapport aux individus contrôles a été observée. Lors d'irradiation aux UV-B c'est donc une combinaison des UV-B et de la chaleur induite qui entraîne la diminution du taux de survie d'*A. vaga* desséchés. Cette expérience devrait être complétée avec un contrôle de la température en temps réel afin de connaître la température induite par les UV-B et la température des individus sur glace.

La limitation de l'augmentation de la chaleur lors d'une irradiation permet d'observer uniquement les effets induits par les UV-B. Notre deuxième expérience a observé l'impact d'une forte dose d'UV-B monochromatique sur la survie. La dose reçue de 25J.cm^{-2} a été reçue en 8 heures ; dans la nature cette dose est reçue en 1 mois durant la période hivernale et par le spectre complet des UV (Chaillol 2011). Cette dose a été suffisante pour tuer tous les individus dans deux des trois répliques. Cependant deux des trois survivants du dernier réplique ont donné une nouvelle population.

Cette expérience a été faite au moyen d'un rayonnement monochromatique et ne représente pas la réalité. Il serait nécessaire de compléter cette expérience avec les mêmes conditions mais avec des radiations d'UV-A et d'UV-C afin de comparer les trois résultats. Cette comparaison permettra d'étudier si expérimentalement une différence entre les types d'UV existe.

Finalement, le vide induit une augmentation des dommages reçus lors d'une irradiation aux UV (Horneck 1992). Une vérification de cette donnée pourrait être acquise lors d'une exposition simultanée au vide et au radiation d'UV-B à une dose de 15J.cm⁻² (dose de la première expérience). Une expérience similaire pourrait utiliser un plus large spectre d'UVs afin de simuler les plus fidèlement possible les conditions spatiales et ainsi voir si *A. vaga* est capable de survivre pendant des périodes importante de vide avec des petites doses d'UV (<1J.cm⁻².jour¹).

L'ensemble de ces expériences réalisées au cours de mon mémoire ont permis de tester et démontrer les résistances du rotifère bdelloïde *A.vaga* à différentes conditions extrêmes (température, irradiations, vide). L'ensemble de ces données nous permettent de postuler et de proposer *A.vaga* comme étant un bon candidat comme organisme modèle d'étude des mécanismes de résistances pouvant entrer en jeu dans les conditions spatiales.

34 L'expression de gènes de réparation lors d'une dessiccation et d'une irradiation

Les rotifères bdelloïdes *Adineta vaga* résistent à la dessiccation, à la congélation, à des températures extrêmes et au vide, l'objectif de la deuxième partie de ce mémoire a été l'étude des mécanismes entrant en jeu dans la réparation des DNA DSBs.

Pour étudier les mécanismes de réparations, nous avons réalisé deux expériences qui sont susceptibles d'activer et de mettre en évidence les mécanismes de réparation de l'ADN chez *A. vaga*. Dans un premier temps nous avons soumis des individus desséchés à une période de dessiccation, lors de cette période le génome des individus d'*A. vaga* subit des cassures. Après une période de 14 jours il a été observé une trainée allant de 225 à 2200 kb lors du contrôle de l'intégrité du génome sur gel (Hespeels et al. 2014), cette trainée est aussi observable après 14 jours de vide mais dans une moindre mesure. Une deuxième expérience a été réalisé avec une exposition de rotifères desséchés à 500Gy de rayons X. Une augmentation est observée dans l'intensité de la trainée. Avec cette irradiation, nous souhaitons augmenter de façon significative le nombre de DNA DSBs et avec cette approche nous espérons augmenter l'intensité de la réponse des gènes des mécanismes de réparation des DNA DSBs.

Les gènes testés appartiennent tous à la voie de réparation NHEJ. Les données transcriptomiques issu de la thèse de Boris HESPEELS suggèrent une upregulation de cette voie. Nous voulons confirmer ces résultats en refaisant l'expérience.

Ces expériences nous montrent que lors d'une période de dessiccation la majorité des gènes testés ont au moins une augmentation significative au cours de la réhydratation par rapport aux individus hydratés. Cette augmentation globale des gènes de réparation de la voie NHEJ est de faible intensité comparé aux niveaux d'expressions des gènes après une irradiation.

Après une irradiation à 500Gy de rayons X, nous observons une augmentation importante de certains gènes après 2h30 de réhydratation (tel Ku70 et Ku80). Cette augmentation diminue de façon graduelle au cours de la réhydratation. Il est important de noter qu'il y a une différence entre le niveau d'expression des ohnologues. En effet dans le cas de Ku80, une augmentation de l'expression relative d'une seule paire allélique durant la réhydratation a été observé et une diminution d'expression de la deuxième paire allélique. Cette expression différentielle est également observée chez les copies des gènes de Ku70 et PKCs.

Les deux protéines Ku70 et Ku80 interviennent au début du mécanisme de réparation, leur augmentation pourrait avoir deux raisons. La première raison pourrait être du au nombre important de DNA DSBs la cellule a besoin d'un nombre important de protéines pouvant initier le mécanisme de réparation. La deuxième raison pour être que le complexe Ku est obligatoirement dégradé à l'issue d'une réparation d'un DNA DSB. La cellule aurait donc besoin d'un plus grand nombre de protéines Ku70 et Ku80 qui ne peuvent être utilisées qu'une seule fois. Les protéines PKCs subissent une phosphorylation au cours de la réparation, la cellule pourrait avoir besoin d'un pool plus important. Ce pool permettrait à la cellule de pouvoir continuer à réparer les dommages sans être limitée par le processus de déphosphorylation des protéines PKCs.

Il serait intéressant de voir s'il y a une augmentation de la concentration des protéines Ku70 et Ku80 dans les cellules en même temps que l'augmentation du niveau d'expression relative des copies de ces gènes.

La voie NHEJ permet le maintien de l'intégrité chimique de l'ADN mais pas du maintien de l'intégrité de l'information génétique. Il a pourtant été montré au cours du mémoire de Christophe ANTOINE qu'après une période de dessiccation ou d'une irradiation les individus semblaient réparer leur génome de façon fidèle.

Dans une optique de comparaison des voies de réparation, il sera nécessaire d'analyser les expressions relatives de gènes spécifiques à la voie HR.

341 Transcriptome

Les résultats de l'étude de l'expression relative de certains gènes clefs dans la voie NHEJ permettent de réfléchir à l'utilité de faire une analyse transcriptomique à tous les *timepoints* analysés est d'analyser le niveau d'expression de tous les ARNm présent dans les différentes conditions. Ces résultats permettent de réfléchir à l'utilité de faire une analyse transcriptomique à tous les *timepoints* analysés précédemment.

En effet le *timepoint* 2h30 réhydratation, dans l'expérience avec les 14 jours de dessiccation, ne semble pas important à l'inverse des 8h réhydratation où l'on observe une *upregulation* importante par rapport aux individus hydratés. Lors de l'étude transcriptomique de la thèse de Boris HESPEELS, les *timepoints* étaient : 2h30 et 4h réhydratation. Nous remarquons avec nos résultats que l'ajout des *timepoints* 8 h et 24 h permettrait d'avoir des informations supplémentaires et précises quant aux mécanismes mis en jeu lors de la réhydratation.

35 L'intégrité du génome après une exposition au vide

Chez *B. subtilis*, l'ADN reçoit des dommages de types DNA DSBs lors de période de vide (Horneck 1993). Nous avons testé l'intégrité du génome d'*A. vaga* desséchés après des périodes de 1 et 14 jours au vide en comparaison avec des individus desséchés gardés 1 et 14 en dessiccation. Nous observons aucunes augmentations significatives de l'intensité des smears visibles des conditions vide sur gel par rapport aux conditions dessiccation. Il semble même observer une diminution de l'intensité du smear chez les individus desséchés exposés 14 jours au vide par rapport aux individus desséchés gardés en dessiccation. Entre les conditions un paramètre est différent et pourrait engendrer cette différence, la température. Dans les chambre climatique servant à la dessiccation, la température est fixée à 23°C, au niveau des chambres à vide la température est de 15°C. Enfin de pouvoir comparer, il faudrait refaire l'expérience avec

des individus gardés en dessiccation mais à 15°C, et des individus gardés en dessiccation à 23°C. Ces individus permettraient de savoir si la température joue réellement un rôle dans les dommages à l'ADN lors d'une période de dessiccation.

4236 Un modèle potentiel pour la recherche spatiale

L'un des objectifs de ce mémoire était de savoir s'il était possible d'utiliser les rotifères bdelloïdes *Adineta vaga* dans la recherche spatiale. De nos jours, les nématodes et les tardigrades sont les principaux groupes d'animaux à être utilisés dans la recherche spatiale, ils ont déjà été soumis à des conditions spatiales, à bord d'un vaisseau spatial ou de l'ISS (Jönsson et al. 2008 ; Erdmann & Kaczmarek 2016).

Nos résultats obtenus, les données de Boris HESPEELS et les résultats de Christophe ANTOINE montrent une importante résistance à la dessiccation, à la congélation, à de hautes températures et aux radiations. De plus *A. vaga* semble être résistant tant à l'état desséchés qu'hydratés. *A. vaga* peut survivre dans le vide avec un taux de survie d'environ 20% après 2 mois. Les résultats laissent supposer qu'ils sont capables de survivre à des expositions de plus longues durées.

Une étude de la résistance à divers paramètres en même temps devrait être effectuée afin de voir l'impact simultané de ces stress, comme expérimenté avec les UV-B et la chaleur que cela induits. L'une des possibilités pour tester cela serait de mettre en place une expérience en ballon sonde au-delà des 40 km de hauteurs afin d'avoir un effet des radiations, de la température et du vide.

Toutes ces données laissent à penser qu'*A. vaga* est capable de survivre à l'état desséchés dans l'espace, et cela même pendant de longues expositions. *Adineta vaga* est donc un modèle approprié pour la recherche spatiale (Caprioli & Ricci 2002 ; Ricci & Caprioli 2005 ; Gladyshech & Meselson 2008)

4	Matériels et méthodes	44
41	Cultures des rotifères bdelloïdes <i>Adineta vaga</i>	44
42	Processus de dessiccation	44
43	Résistances à la température	44
44	Lyophilisation et vide	45
45	Extraction d'ARN, quantification et retro-transcription en ADNc	45
46	Analyse via une quantitative PCR	46
47	Irradiations	47
48	PFGE	47

4 Matériels et méthodes

41 Cultures des rotifères bdelloïdes *Adineta vaga*

Les expériences de ce mémoire ont été effectuées sur une lignée clonale d'*Adineta vaga* (Flot et al. 2013). Les cultures sont gardées continuellement hydratées dans des boîtes de Petri de 150 x 200 mm (Greiner®) avec de l'eau de SPA® à une température de 21°C. Les cultures sont nourries avec du jus de laitue stérile, soit une fois par semaine afin de maintenir une densité de population soit deux fois par semaines afin de faire croître la population.

42 Processus de dessiccation

Les rotifères bdelloïdes *A. vaga* sont desséchés suivant le protocole publié dans Hespeels et al. (2014) : des cultures propres et « en bonne santé » d'*A. vaga* sont mises à jeun pendant deux jours en remplaçant le milieu d'origine par 15mL d'eau SPA®. A l'issue de cette période, les individus sont détachés de la surface de la boîte de Petri par un moyen mécanique. La boîte de Petri est agitée au moyen d'un vortex (BR-2000 vortexer, Bio-Rad ®) pendant une durée de 15 secondes. Le surnageant est transféré dans un tube Falcon de 15mL puis centrifugé (Eppendorf® centrifuge 510) à 4000g pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et les individus sont regroupés et re-suspendu dans un volume d'eau. Un volume de 1mL du milieu concentré en *A. vaga* (environ 50.000 individus) est déposé au centre d'une boîte de Petri contenant 3% d'agarose LMP UltraPure™ (Invitrogen Carlsbad 16520-100) à 3%. Les boîtes de Petri sont placées dans une chambre climatique (WEKK 0028) et soumises au protocole suivant : l'humidité relative décroît de manière linéaire de 70% à 55% pendant 17h, puis une diminution linéaire de 55% à 41% en 1 heure. Ce pourcentage d'humidité relative est par la suite maintenu constant de 21 heures à plusieurs semaines en fonction du temps souhaité pendant laquelle *A. vaga* sera maintenant en état de dessiccation. Ce protocole permet l'obtention de rotifères déssiqués en approximativement 48h.

43 Résistances à la température

Pour les expositions à de fortes températures, des groupes d'*A. vaga* desséchés ont été placés dans des Eppendorf® de 1,5ml ou dans des Eppendorf® pour PCR. Les températures testées sont 56, 65,75 et 100°C. Les Eppendorf® de 1,5 ml ont été placés soit dans un bain sec (Fisher scientific dry bath FB15103) pour la température 100°C soit dans un bain marie pour les 3 autres températures, pendant une période allant de 2 heures à 48 heures (les durées inférieures à 30 minutes ne permettent pas d'atteindre la température cible au sein de l'échantillon). Après l'exposition à ces températures, les groupes d'*A. vaga* ont été réhydratés au moyen d'un ajout de 15 ml d'eau SPA® dans une boîte de Petri de 96 * 16 mm et gardé à 21°C. Une heure après la réhydratation, 45µL de jus de laitue a été ajouté. Les Eppendorf® pour PCR ont été placés dans un thermocycleur, les températures testées sont 75 et 99°C, le programme utilisé est à une température initiale de 21°C avec une augmentation graduelle de la température de 1°C.min⁻¹ jusqu'à la température maximale fixé.

Amorces	Séquence Sens	Séquence Anti-Sens
ATM2	CAAGGTCTTTTAAGAAAAGTTGTGA	TTAATGTATCCGCATATTGACG
Ku70-A1	CTTCCTGAAACAGCGGAAAT	GCATCAAATAGAACACGACGA
Ku70-B2	AAAATTGTTACCAAACATTATCTTCC	TTGAATATCTGACGGCATGAG
Ku80-A2	GGAACCTTTATTTACATTTGAGAAGC	TTGCATGATATATTTGTTGCTG
Ku80-B2	TGGCAATAATGATATTTCAAGCA	CAGTTGTCGCTTCTTCACCA
L40MT	GGTTTTACGACTTCGTGGTGG	GACCACATTTACGCTTACGACA
Lig4-1	GAAAGGAAGGTCAAAAGATTATCG	TCCAGAGCACTGAGATGACG
Pkcs-A2	TGTGAATCAATTTGAAACAGCTAAA	AGCTCGCATTGTATCTTGAGG
Pkcs-B1	TTACCGCTGCGGATCTTAAA	ACGAAGTGCCTCCTTCAATG
PollA2	GGAGTTATTCGAATGGGGAAA	CGATTCTTCAGTTGGTGTTGG
XRCC4-1	TGAAGTTTATCGAAGATGATGGA	TTGCTGCTCGTAACATGTCC

Tableau 4. Liste des amorces utilisées en qPCR et de leur séquence.

Pour les expositions à faibles températures, 10.000 *A. vaga* hydratés ont été regroupés et mis dans un tube Falcon de 15 mL avec 10 mL d'eau de SPA®. Puis ils sont stockés à -80°C (New Brunswick Ultra Low Temperature Freezer U410 Premium) et à -26°C dans un congélateur pour une durée de 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 6 mois. La décongélation des échantillons a été effectuée à température ambiante, une fois décongelé *A. vaga* est transféré dans une boîte de Petri de 96 x 16 mm et nourri avec 45µL de jus de laitue une heure après.

La survie est mesurée en comptant le nombre d'individu vivant et mort, les échantillons décongelés ou réhydratés sont placés dans des boîtes de Petri de 96 x 16 mm puis nourris avec 45µL de jus de laitue une heure après, le volume final de ces cultures est de 15 mL. Les individus vivants et morts sont regroupés et comptés séparément 48 heures après la décongélation ou réhydratation.

Le test de fertilité est fait dans le 24 heures après la décongélation ou réhydratation, 60 ou 120 individus sont isolés par conditions et placé dans un puits d'une plaque 12 puits avec 2 ml d'eau de SPA®, 10 µL de jus de laitue est ajouté afin de les nourrir. L'apparition de nouvelles populations et le nombre d'*A. vaga* est compté après 14 jours.

44 Lyophilisation et vide

Des groupes d'*A. vaga* desséchés (environ 8.000 individus) sont mis dans des Eppendorf® de 1,5 mL et stockés à -80°C pendant une nuit. Les échantillons sont exposés pendant 24 heures au vide d'un lyophilisateur ou exposés de 24 heures à 2 mois au vide d'une chambre atmosphérique à une pression inférieure à 10^{-6} mmHg. La réhydratation est effectuée comme décrite partie 43.

45 Extraction d'ARN, quantification et retro-transcription en ADNc

Des *A. vaga* hydratés ou desséchés ont été collectés suivant le protocole dans (Hespeels et al. 2015), l'extraction de l'ARN a été effectuée au moyen du kit Ambion RNAqueous®-4PCR et avec du TRIzol®. Le protocole a été modifié, le tampon de lyse est maintenant pendant 30 minutes dans les échantillons, et l'étape d'élution est faite 2 fois, d'abord avec 40µL de solution d'élution puis avec 20µL de cette même solution. La quantité totale d'ARN a été mesurée au NanoDrop spectrophotometer (Thermo scientific Nanodrop 2000c) et avec Agilent. Cette mesure a été effectuée avant et après un traitement DNase. Le total des ARNs extrait est enrichi en ARNm en utilisant les queues polyA, et en les convertissant en ADNc simple brin en utilisant des amorces d'hexamère.

46 Analyse via une quantitative PCR

Des amorces ont été designées afin de cibler spécifiquement le cDNA de couples d'allèles. Pour cela l'une des amorces s'apparie à cheval sur deux exons pour ne pas amplifier de l'ADN génomique. Le nom des amorces et leurs séquences sont repris dans le tableau 4.

Le nombre de copies d'un gène a été déterminé en blastant une séquence connue du gène d'intérêt sur le génome complet d'*A. vaga*, cette analyse a été faite via les logiciel BioEdit. Un alignement de tous les allèles trouvés a ensuite été effectué au moyen du logiciel Geneious afin de regrouper les paires alléliques entre elle. Une paire d'amorce amplifie spécifiquement les deux allèles homologues d'une paire. Si plus de 2 allèles ont été retrouvés dans le génome, une deuxième paire amplifie le ou les allèles ohnologes. A partir de ces paires alléliques, des amorces ont été créées afin d'être spécifique à une paire d'allèle et non pas à un seul allèle au moyen du site Primer3 (bioinfo.ut.ee) avec comme paramètre une température d'appariement d'environ 60°C.

Les amplifications en PCR en temps réel ont été effectuées en utilisant une StepOne plus real time PCR System (Applied Biosystems). Le transcrit de l'« Ubiquitin-60S ribosomal L40 » a été utilisé comme contrôle pour normaliser les gènes d'intérêt. Chaque réaction de PCR a consisté en 20 µL contenant 5 µL de l'échantillon de cDNA dilué (1 : 50), 10 µL d'Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad), 2,5 µL de l'amorce sens et 2,5 µL de l'amorce anti-sens. Les conditions de la PCR étaient les suivantes : 1 cycle de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 30 secondes à 60°C pour l'appariement des amorces et 15 secondes à 9°C. La fluorescence était mesurée à chaque fin de cycle. Une « melting curve » (60°C – 95°C avec une augmentation de 0,7°C par intervalles) a été effectuée pour chaque amorces afin de vérifier la présence d'un seul pique spécifique du gène. Chaque réaction de PCR a été effectuée en dupliquas techniques sur des quadruplicas biologiques. Le point où le produit de PCR dépasse un seuil, nommé le « cycle threshold » (Ct), a été déterminé pour chaque échantillons, et la moyenne des Ct des répliquas a été utilisée pour les analyses. Les analyses ont été effectuées en suivant la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Les études statistiques ont été effectuées au moyen de la méthode de Holm-Sidak.

47 Irradiations

Des groupes d'*A. vaga* desséchés et des cultures hydratés d'*A. vaga* (environ 25.000 individus) sont irradiés à une dose finale de 500Gy avec un rayonnement de 6,76 Gy par minutes.

Des *A. vaga* desséchés sont soumis à une radiation au UV-B (longueur d'onde de 312 nm) généré par 3 lampe TL 20 W/01 (Philips, Eindhoven, The Netherlands). Des échantillons étaient maintenant à une faible température via un bloc de glace mis sous les échantillons, des échantillons étaient recouvert avec du papier noir bloquant 100% des UV-B, et des échantillons contrôles qui étaient resté à 4°C dans un frigo. La dose précise d'énergie émit par les lampes était mesurée en temps réel via un UVR radiometer Vilber VLX3W avec un récepteur UV-B (312 nm).

48 PFGE

Les individus d'*A. vaga* nécessaires à la préparation des échantillons sont tout d'abord récoltés. Le culot obtenu à la fin de l'opération a été transvasé dans un eppendorf 1.5 ml et rempli d'eau de Spa®. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16.100g pendant 1 minute 10 à température ambiante. Le surnageant a été retiré et remplacé par 1.5 ml de solution A (50 mM d'EDTA pH 8.0 ; 10 mM de Tris HCl) afin d'effectuer un rinçage. Après avoir à nouveau centrifugé selon les mêmes paramètres, le surnageant a été remplacé par 500 µl de la même solution.

Six comptages ont été réalisés en prélevant 2 µl des 500 µl et en les déposant dans du Technisolve. Le nombre total de bdelloïdes a été calculé sur base de ces 6 comptages. Des volumes contenant approximativement 1.000 individus ont été prélevés. Après une nouvelle centrifugation (14400 rpm pendant 1 minute 10), les échantillons ont été observés au binoculaire afin de les classer selon leur qualité (présences de crasses pouvant gêner la migration de l'ADN, etc.).

Ces volumes ont été mélangés avec de l'agarose LMP fondu Invitrogen® 0.8% (LMPA ; NuSieve GTG Lonza (Rockland, ME, USA)) pour un volume total de 50 µl. Les mélanges échantillon-agarose ont été déposés dans des moules prévus à cet effet. Après polymérisation de l'agarose, les plugs ont été transférés dans 500 µl de Digestion Buffer (pour un échantillon : 207.34 µl d'eau milliQ ; 250 µl de Solution B ; 16.66 µl de N-Lauroylsarcosine sodium salt solution (or sarkosyl, from Sigma®) ; 26 µl de Protéinase K (~20 mg/ml by Thermo

Scientific®). Les plugs ont ensuite été laissés à 4°C pendant 1 heure, puis placés à 56°C pendant 18 heures pour digestion.

Après 18h de digestion, les plugs ont été rincés 3 fois avec du TBE 0.5× (Tris Borate EDTA, BioRad®). Les plugs ont été placés à 4°C pendant 3 heures, et rincés une dernière fois après ce temps d'attente. Après ce dernier, les plugs ont été stockés dans 500 µl d'EDTA pH 8.0 s'ils n'étaient pas utilisés dans la journée.

Afin d'observer les cassures double brin, la réparation ou de possible réarrangements chromosomiques, une PFGE a été réalisées avec les échantillons. Deux machines ont été utilisées, la CHEF MAPPER et la CHEF DRII (BioRad®).

Les échantillons en plug ont été placés dans un gel à 0,8 d'agarose (LMPA, TBE 0,5×). L'ADN présent dans le gel a été marqué au SYBR Gold (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) et scanné par une caméra XRS BioRad Chemidoc. Le programme de quantification ImageLab 3.0 et ImageJ ont été utilisés pour traiter les images.

Les paramètres de migration ont été basés sur Hespeels et al. 2014 pour la CHEF MAPPER, et adaptés pour la CHEF DRII. Les paramètres de base étaient les suivants (paramètres automatiques non compris) : Voltage : 190 V ; Temps de migration : 22 heures ; Intervalle initial : 60 secondes ; Intervalle final : 185 secondes.

Bibliographie

- Alpert, P., 2006. Constraints of tolerance : why are desiccation-tolerant organisms so small or rare ? , pp.1575–1584.
- Alpert, P., 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45, pp.685–695.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L. & Cramer, C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants : Relationships in green cells. , pp.224–233.
- Aparicio, T., Baer, R. & Gautier, J., 2014. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, 19, pp.169–175.
- Asgarani, E. et al., 1999. Mechanisms of DNA protection in *Halobacterium salinarum*, an extremely halophilic bacterium. *Microbiological Research*, 154(2), pp.185–190.
- Asgarani, E. et al., 2000. Purification and characterization of a novel DNA repair enzyme from the extremely radioresistant bacterium *Rubrobacter radiotolerans*. *Journal of radiation research*, 41(1), pp.19–34.
- Baglioni, P., Sabbatini, M. & Horneck, G., 2007. *Astrobiology Experiments in Low Earth Orbit : Facilities , Instrumentation , and Results*,
- Bose, J., 2016. In Vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Functional B Islets Under 2D and 3D Culture Conditions and In Vivo Preclinical Validation of 3D Islets. *Methods in Molecular Biology*, 1373(111–5).
- Buitink, J. & Leprince, O., 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state. *Cryobiology*, 48(3), pp.215–228.
- Butlin, R., 2002. Evolution of sex: The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nature reviews. Genetics*, 3(4), pp.311–317.
- Caprioli, M. & Ricci, C.N., 2002. Enhanced stress resistance of dormant bdelloids (rotifera). In *Proceedings of "Life in space for life on Earth". 8th European Symposium on Life Sciences Research in Space. 23rd Annual International Gravitational Physiology Meeting*. pp. 319–320.
- Caprioli, M. & Ricci, C.N., 2001. Recipes for successful anhydrobiosis in bdelloid rotifers. In *in : L. Sanoamuang, H. Segers, R.f. Shiel & R.D. Gulati (eds), Rotifera IX*. pp. 13–17.
- Carpenter, J.F., Prestrelski, S.J. & Anchordoguy, T.J., 1994. *Interactions of Stabilizers with Proteins During Freezing and Drying*,
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B. & D'Andrea, A., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double- Strand Break. , 26(1), pp.52–64.
- Clegg, J.S., 2001. Cryptobiosis - A peculiar state of biological organization. *Tsitologiya*, 44(10), pp.1011–1014.
- Clegg, J.S., 1986. The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: the water replacement hypothesis. *Membranes, metabolism and dry organisms*, pp.169–187.
- Colleran, P.N. et al., 2000. Alterations in skeletal perfusion with simulated microgravity: a possible mechanism for bone remodeling. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 89(3), pp.1046–1054.
- Crowe, J.H., 1971. Anhydrobiosis : An Unsolved Problem. *The American Naturalist*, 105(946), pp.563–573.
- Crowe, J.H., 2007. Trehalose As a "Chemical Chaperone": Fact and Fantasy. In *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*. pp. 143–158.

- Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman, D., 1984. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science*, 223(4637), pp.701–703.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. & Crowe, L.M., 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 54, pp.579–599.
- Davis, H., 1873. A new Callidina: with the Result of Eperiments on the Dessiccation of Rotifers. *The monthly microscopical journal*, XIV, pp.201–209.
- Debortoli, N. et al., 2016. Genetic exchange among bdelloid rotifers is more likely due to horizontal gene transfer than to meiotic sex. *Current Biology*, 26(6), pp.723–732.
- Donner, J., 1965. *Ordnung Bdelloidea (Rotifera, Rädertiere)*.
- Eyres, I. et al., 2015. Horizontal gene transfer in bdelloid rotifers is ancient, ongoing and more frequent in species from desiccating habitats. *BMC Biology*, 13(1), p.90.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension. *Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension*, pp.108–115.
- Fischer, C. et al., 2013. How does the “ancient” asexual *Philodina roseola* (Rotifera: Bdelloidea) handle potential UVB-induced mutations? *Journal of Experimental Biology*, 216(16), pp.3090–3095.
- Fitts, R.H., Riley, D.R. & Widrick, J.J., 2000. Physiology of a Microgravity Environment Invited Review: Microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 89, pp.823–839.
- Flot, J. et al., 2013. Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature*, 500(7463), pp.453–457.
- Fontaneto, D., 2001. Rotifera Bdelloidea. *Systematics*, pp.1–11.
- Gladyshev, E. & Meselson, M., 2008. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), pp.5139–5144.
- Guidetti, R. & Jönsson, K.I., 2002. Long-term anhydrobiotic survival in semi-terrestrial micrometazoans. *Journal of Zoology*, 257(2), pp.181–187.
- Gusev, O. et al., 2010. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: Linkage with radioresistance. *PLoS ONE*, 5(11).
- Hand, S.C. et al., 2011. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annual Review of Physiology*, 73(1), pp.115–134.
- Harms-ringdahl, M. et al., 2005. Radiation tolerance in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 81(9), pp.649–656.
- Hespeels, B. et al., 2015. Against all odds: Trehalose-6-phosphate synthase and trehalase genes in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* were acquired by horizontal gene transfer and are upregulated during desiccation. *PLoS ONE*, 10(7), pp.1–23.
- Hespeels, B. et al., 2014. Gateway to genetic exchange? DNA double-strand breaks in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* submitted to desiccation. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(7), pp.1334–1345.
- Heyer, W., Ehmsen, K. & Liu, J., 2009. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 44, pp.113–139.
- Honjoh, K.-I. et al., 1999. Introduction of the hiC6 Gene, which Encodes a Homologue of a Late Embryogenesis Abundant (LEA) Protein, Enhances Freezing Tolerance of Yeast. *Journal of Plant Physiology*, 155(4–5), pp.509–512.

- Horneck, G., 1993. Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: Results from experiments in space. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 23(1), pp.37–52.
- Hsu, W.S., 1956. Oogenesis in the bdelloidea rotifer *Philodina roseola* (Ehrenberg). *La Cellule*, 57, pp.283–296.
- Hussain, S.A., 1975. Ultraviolet Radiation Effects On Rotifers.
- IARC, 1992. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*,
- Jolivet, E. et al., 2003. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), pp.847–851.
- Jönsson, K.I. et al., 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, 18(17), pp.729–731.
- Jönsson, K.I. & Wojcik, A., 2017. Tolerance to X-rays and Heavy Ions (Fe, He) in the Tardigrade *Richtersius coronifer* and the Bdelloid Rotifer *Mniobia russeola*. *Astrobiology*, 17(2), pp.163–167.
- Kanazawa, M., Nanri, T. & Saigusa, M., 2017. Anhydrobiosis Affects Thermal Habituation in the Bdelloid Rotifer, *Adineta* sp. *Zoological Science*, 34(2), pp.81–85.
- Karran, P. & Brem, R., 2016. Protein oxidation , UVA and human DNA repair. *DNA Repair*, 44, pp.178–185.
- Keilin, D., 1959. The Problem of Anabiosis or Latent Life: History and Current Concept. *Proc. Roy. Soc. Lond*, 150(939), pp.149–191.
- Koestler, A.G., 1965. *The effect on the chimpanzee of rapid decompression to a near vacuum*,
- Kranner, I. & Birti, S., 2005. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance 1. *Integr. Comp. Biol*, 45(November), pp.734–740.
- Krinsky, N.I., 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 66(5), pp.1003–1010.
- Krisko, A. et al., 2012. Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), pp.2354–2357.
- Lapinski, J. & Tunnacliffe, A., 2003. Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS Letters*, 553(3), pp.387–390.
- Li, D. & He, X., 2009. Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules*, 10(6), pp.1469–1477.
- MacRae, T.H., 2000. Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 57, pp.899–913. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950306>.
- Makarova, K. et al., 2001. Genome of the Extremely Radiation-Resistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* Viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), pp.44–79.
- Mark Welch, D.B., Mark Welch, J.L. & Meselson, M., 2008. Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), pp.5145–5149.
- Marotta, R. et al., 2010. Dry and survive : Morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *Journal of Structural Biology*, 171(1), pp.11–17.

- Mattimore, V. & Battista, J.R., 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology*, 178(3), pp.633–637.
- Maynard, S.J., 1986. Evolution: contemplating life without sex. *Nature*, 324(6095), pp.300–301.
- Melone, G. & Ricci, C., 1995. Rotatory apparatus in Bdelloids. *Hydrobiologia*, 313–314(1), pp.91–98.
- Mertens, J. et al., 2008. Survival of dried eukaryotes (anhydrobiotes) after exposure to very high temperatures. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(1), pp.15–22.
- Mole, R.H., 1984. The LD50 for uniform low LET irradiation of man. *The British Journal of Radiology*, 57(677), pp.355–369.
- Nasa, 2017. *Apollo 15 Lunar Surface Journal*,
- Nickoloff, J.A., 2017. Paths from DNA damage and signaling to genome rearrangements via homologous recombination. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 806, pp.64–74. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510716301798>.
- Örstan, A., 2017. An introduction to bdelloid rotifers. , (2), pp.1–11.
- Pagani, M., Ricci, C.N. & Redi, C.A., 1993. Oogenesis in *Macrotrachela quadricornifera* (Rotifera, Bdelloidea). I. Germanium eutely, karyotype and DNA content. In *Gilbert J.J., Lubzens E., Miracle M.R. (eds) Rotifer Symposium VI. Developments in Hydrobiology*. pp. 225–230.
- Postow, L. et al., 2008. Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *Journal of Cell Biology*, 182(3), pp.467–479.
- Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews*, 58(4), pp.755–805.
- Potts, M., 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 34(4), pp.319–328.
- Potts, M., 1996. The anhydrobiotic cyanobacterial cell. *Physiologia Plantarum*, 97(4), p.788–794.
- Radzikowski, J., 2013. Resistance of dormant stages of planktonic invertebrates to adverse environmental conditions. *Journal of Plankton Research*, 35(4), pp.707–723.
- Rahm, P.G., 1924. Weitere physiologische Versuche mit niederen Temperaturen. *Verh dtsch zool Ges*, 29, pp.106–111.
- Rastogi, R.P. et al., 2010. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, pp.1–32.
- Rebecchi, L. et al., 2009. Survival and DNA degradation in anhydrobiotic tardigrades. *Journal of Experimental Biology*, 212(24), pp.4033–4039.
- Ricci, C., 2017. Bdelloid rotifers : “ sleeping beauties ” and “ evolutionary scandals ”, but not only. *Hydrobiologia*, 796(1), pp.277–285.
- Ricci, C. & Caprioli, M., 2005. Anhydrobiosis in bdelloid species, populations and individuals. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), pp.759–763.
- Ricci, C. & Covino, C., 2005. Anhydrobiosis of *Adineta ricciae*: Costs and benefits. *Hydrobiologia*, 546(1), pp.307–314.
- Ricci, C. & Fontaneto, D., 2009. The importance of being a bdelloid: Ecological and evolutionary consequences of dormancy. *Italian Journal of Zoology*, 76(3), pp.240–249.
- Ricci, C.N., 1987. Ecology of bdelloids: how to be successful. *Hydrobiologia*, 147(1), pp.117–127.

- Ricci, C.N. et al., 2008. Volume and Morphology Changes of a Bdelloid Rotifer Species (*Macrotrachela quadricornifera*) During Anhydrobiosis. *Journal of Morphology*, 268, pp.233–239.
- Ricci, C.N., Caprioli, M. & Fontaneto, D., 2007. Stress and fitness in parthenogens: is dormancy a key feature for bdelloid rotifers? *BMC evolutionary biology*, 7 Suppl 2, p.S9.
- Rulten, S.L. & Grundy, G.J., 2017. Non-homologous end joining: Common interaction sites and exchange of multiple factors in the DNA repair process. *BioEssays*, 1600209, p.1600209.
- San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H., 2008. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), pp.229–257. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>.
- Sazykina, T. et al., 2003. *Radiation effects on biota*,
- Segers, H.H., 2007. *Annotated checklist of the rotifers (Phylum Rotifera), with notes on nomenclatures, taxonomy and distribution*,
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), pp.514–525.
- Setlow, R.B., 1974. The Wavelengths in Sunlight Effective in Producing Skin Cancer: A Theoretical Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(9), pp.3363–3366.
- Sharma, A. et al., 2016. Ectopic expression of an atypical hydrophobic group 5 LEA protein from wild peanut, *Arachis diogeni* confers abiotic stress tolerance in tobacco. *PLoS ONE*, 11(3), pp.1–31.
- Shibata, A., 2017. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 803–805(July), pp.51–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.011>.
- Signorovitch, A. et al., 2015. Allele sharing and evidence for sexuality in a mitochondrial clade of bdelloid rotifers. *Genetics*, 200(2), pp.581–590.
- Slade, D. & Radman, M., 2011. *Oxidative Stress Resistance in Deinococcus radiodurans*,
- Sottile, M.L. & Nadin, S.B., 2017. Heat shock proteins and DNA repair mechanisms: an updated overview. *Cell Stress and Chaperones*, pp.1–13.
- Space Studies Board, 2000. *Radiation and the International Space Station*,
- Stein, T. et al., 2002. Energy metabolism pathways in rat muscle under conditions of simulated microgravity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(8), p.471.
- Sutherland, B.M. et al., 2002. Clustered DNA damages induced by x rays in human cells. *Radiation research*, 157(6), pp.611–616.
- Thirsk, R. et al., 2009. The space-flight environment: the International Space Station and beyond. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 180(12), pp.1216–20.
- Thompson, L.H. & Schild, D., 2001. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1–2), pp.131–153.
- Tunnacliffe, A. & Wise, M.J., 2007. The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94(10), pp.791–812.
- United Nations Scientific Committee, 2008. *Sources and Effects of Ionizing Radiation*,

- Wallace, S.S., 1998. Enzymatic Processing of Radiation-Induced Free Radical Damage in DNA. *Radiation Research*, 150(5), pp.60–79.
- Ward, J.F., 1988. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35(C), pp.95–125.
- Watanabe, M., 2006. Anhydrobiosis in invertebrates. *Applied Entomology and Zoology*, 41(1), pp.15–31.
- Welch, D.M., 2000. Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers Without Sexual Reproduction or Genetic Exchange. *Science*, 288(5469), pp.1211–1215.
- Welnicz, W. et al., 2011. Anhydrobiosis in tardigrades-The last decade. *Journal of Insect Physiology*, 57(5), pp.577–583.
- Weterings, E. & Chen, D.J., 2008. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Research*, 18(1), pp.114–124.
- Williams, A.B. & Schumacher, B., 2016. p53 in the DNA damage repair process. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(5), p.10.1101/cshperspect.a026070 a026070. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852800/>.
- Williams, G. et al., 2014. Structural insights into NHEJ: building up an integrated picture of the dynamic DSB repair super complex, one component and interaction at a time. *DNA Repair*, 17, pp.110–120.
- Willot, Q., Gueydan, C. & Aron, S., 2017. Proteome stability, heat hardening, and heat-shock protein expression profiles in Cataglyphis desert ants. *The Journal of Experimental Biology*, (February), p.jeb.154161.
- Wright, J.C., 2001. Cryptobiosis 300 Years on from van Leeuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 240(3–4), pp.563–582.
- Wu, J. et al., 2017. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), pp.226–256. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.009>.
- Zelmann, R. et al., 2010. Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Clinical Neurophysiology*, 26(10), pp.875–880.
- Zhang, L. et al., 2000. Expression cerevisiae of Plant Revealed Group 2 and Group 3 lea Genes in Saccharomy Functional Divergence among LEA Proteins abundant expression moter , and the gene products transformants to a medium containing in a medium containing During periods of wa. *J. Biochem.*, 127(4), pp.611–616.

Sites

- http://www.esa.int/Our_Activities/Space_Science/Extreme_space/Surviving_extreme_conditions_in_space (05/11/2017)
- http://www.spirit-science.fr/doc_terre/Schumann.html (05/11/2017)
- <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2013/space-human-body/> (05/11/2017)
- https://science.nasa.gov/science-news/science-at-nasa/2001/ast21mar_1 (05/11/2017)
- <http://www.srh.noaa.gov/srh/jetstream/atmos/layers.html> (05/11/2017)
- <https://www.scientificamerican.com/article/survival-in-space-unprotected-possible/> (05/11/2017)

<http://www.geoengineeringwatch.org/geoengineering-is-destroying-the-ozone-layer/> (06/11/2017)

http://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/effet-sur-homme/effets-rayonnements-ionisants/Pages/4-consequences-niveau-cellule.aspx?dId=b58d9f9a-7224-425b-a349-1eccb3166958&dwId=a8593a58-4f24-4ffe-859f-89528a4e1579#.WS_Zd8akJPY (06/06/2017)

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

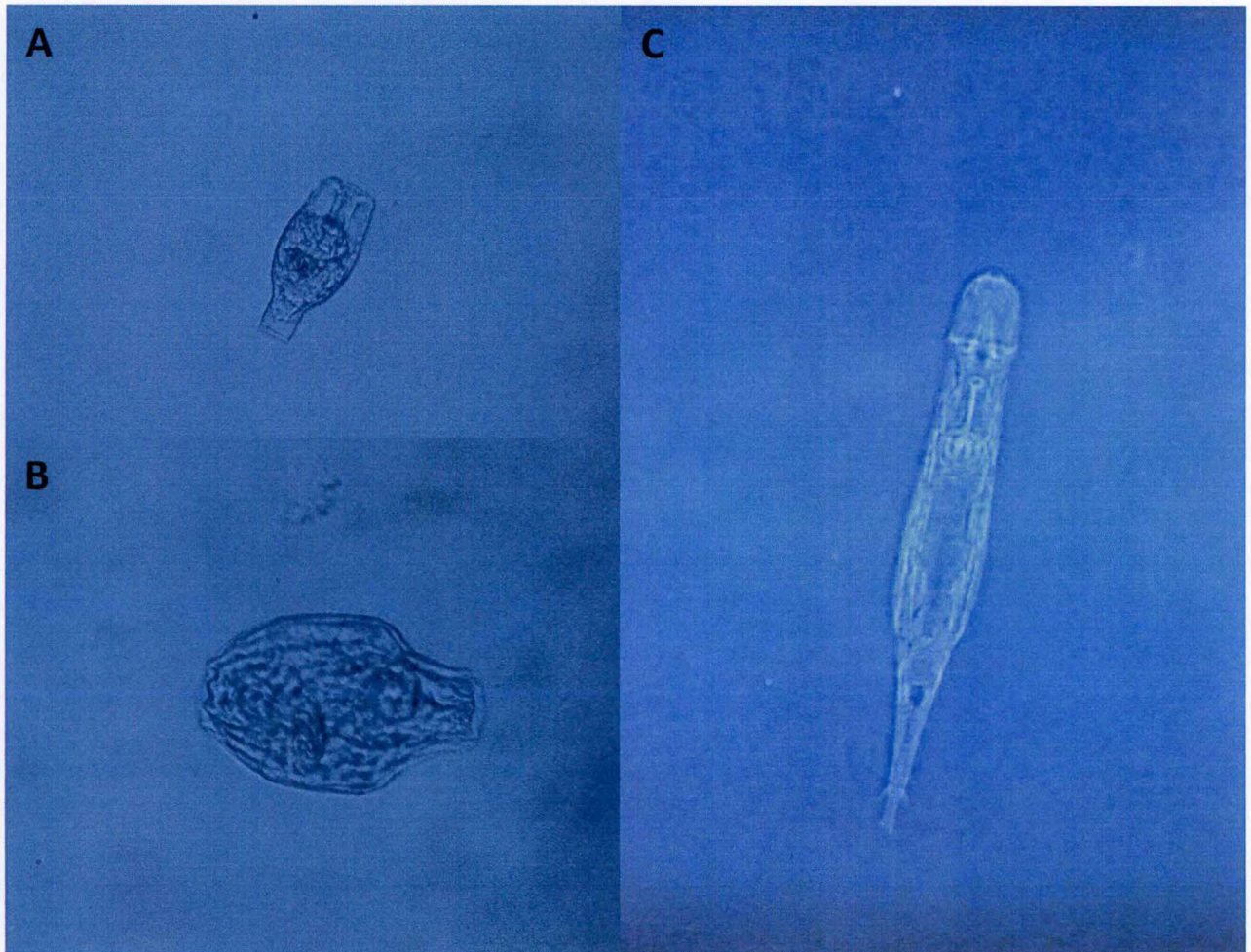
https://www.nasa.gov/mission_pages/LADEE/news/lunar-atmosphere.html (19/11/2017)

<http://www.insidegnss.com/node/3177> (05/11/2017)

<http://www.iapws.org/faq1/boil.html> (14/06/2017)

Annexe 1 :

- A : *Adineta vaga* mort
B : *Adineta vaga* en tun
C : *Adineta vaga* actif



Photographié par M. SILVESTRE